

Departamento de Química

**Avaliação da toxicidade do fármaco anti-HIV abacavir:
síntese e caracterização estrutural de possíveis
biomarcadores**

Catarina Sofia Romão Charneira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para
a obtenção do grau de Mestre em Bioorgânica.

Orientador Científico: Doutora Alexandra Maria Mota Antunes

Co-orientador Científico: Doutora Paula Cristina de Sérió Branco

**Lisboa
2010**

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Alexandra Antunes a incansável simpatia e disponibilidade por uma vez mais me ter transmitido os seus conhecimentos científicos, pela motivação e entusiasmo constantes na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Matilde Marques por partilhar os conhecimentos científicos e pelas opiniões dadas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Quero ainda agradecer-lhes pela oportunidade e pelo convívio durante a estadia em Barcelona.

À Professora Doutora Paula Branco pela disponibilidade e por ter possibilitado a realização do trabalho.

À Doutora Conceição Oliveira pelas análises de Espectrometria de Massa, pela disponibilidade e simpatia.

À Doutora Sofia Azeredo Pereira pelo trabalho no isolamento da fracção citosólica do fígado de rato.

Agradeço ainda às Redes Nacionais de Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear pelo acesso aos aparelhos e ao programa “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program” pela disponibilização da amostra padrão de abacavir.

A todos os meus colegas de laboratório dos grupos VII e II do CQE (IST): Edson, Shrika, Tiago, Gonçalo, David, Pedro P., Pedro M., Sara, Ivânia, Ana Sofia e Marta e em especial à Filipa pelos conselhos e pelo apoio, à Ana pela seu apoio na área “Bio” e à Inês pelo companheirismo.

Ao Luís pela motivação, apoio e paciência nos momentos menos bons. À Nídia, à Rita, à Susana e ao Márcio pelo carinho e amizade.

E finalmente quero agradecer aos meus pais e irmã por tornarem mais uma etapa possível, em especial à minha mãe por todo o apoio e incentivo constantes.

Resumo

A oxidação de Swern do abacavir permitiu a preparação dos dois aldeídos que se pensam estar envolvidos na via metabólica deste fármaco anti-HIV, o (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (aldeído conjugado) e o (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (aldeído não conjugado).

A reactividade do aldeído conjugado foi estudada *in vitro* na presença de vários bionucleófilos. Na reacção com a lisina, após tratamento com cianoboro-hidreto de sódio, foi possível detectar a formação de um aducto covalente, por LC-MS. No entanto, apesar das diversas tentativas para isolar este aducto por HPLC semi-preparativo, não foi possível isolá-lo em quantidade suficiente para possibilitar a sua caracterização por RMN. Similarmente, na reacção de modificação do valinato de etilo com este derivado electrófilo, seguida de redução, o aducto formado foi apenas detectado por LC-MS. No entanto, com o tratamento desta mistura reaccional com fenilisotiocianato (degradação de Edman) foi possível simplificar a mistura reaccional possibilitando o isolamento dum aducto sob a forma de uma feniltiohidantoína, com um rendimento de 15%, que foi caracterizado estruturalmente por RMN e EM. Curiosamente, quando se modificou o valinato de etilo com o aldeído não conjugado obteve-se a mesma tio-hidantoína. Este resultado sugere que o aldeído não conjugado quando formado *in vivo* rapidamente isomeriza ao aldeído conjugado, termodinamicamente mais estável. Assim, será o aldeído conjugado o intermediário electrófilo responsável pela reacção com os bionucleófilos que leva à formação de aductos covalentes, via base de Schiff, que se pensam estar na origem das reacções tóxicas associadas ao abacavir.

A feniltiohidantoína preparada foi posteriormente utilizada como padrão para monitorizar, por LC-MS, a formação de aductos com os resíduos de valina N-terminal da Hemoglobina (Hb), formados por modificação desta proteína com o aldeído conjugado seguida de degradação de Edman. A incubação do abacavir na fracção citosólica de fígado de rato, seguida de adição de valinato de etilo, redução e degradação de Edman permitiu a identificação por LC-MS, por comparação com o padrão, da mesma feniltiohidantoína.

Estes resultados preliminares sugerem que a via metabólica do abacavir que conduz à formação do 1''-carboxilato, via um intermediário aldeído, poderá estar ligada às reacções de hipersensibilidade associadas ao abacavir. Adicionalmente, o aducto formado com a valina N-terminal da Hb, sendo de fácil monitorização, poderá ser um possível biomarcador de toxicidade do abacavir.

Abstract

The two metabolic plausible abacavir aldehyde derivatives, (*S*)-4-[2'-amine-6'-(cyclopropylamine)-9H-purin-9'-yl]cyclopent-1-enecarbaldehyde (conjugated aldehyde) and (*S*)-4-[2'-amine-6'-(cyclopropylamine)-9H-purin-9'-yl]cyclopent-2-enecarbaldehyde (unconjugated aldehyde), were synthesized by Swern oxidation of the anti-HIV drug abacavir.

The *in vitro* reactivity of the conjugated aldehyde was investigated towards several bionucleophiles. The reaction with the amino acid lysine, followed by reduction by sodium cyanoborohydride, allowed the identification by LC-MS of a covalent adduct. In spite of several attempts to isolate this adduct by semi-preparative HPLC, the low amount of sample precluded its structural assignment by NMR. Likewise in the reaction of this electrophilic derivative with ethyl valinate, followed by reduction, the covalent adduct formed could only be detected by LC-MS. However, upon subsequent treatment with phenyl isothiocyanate (*N*-alkyl Edman degradation), a considerable simplification of the reaction mixture was achieved, allowing the isolation of a phenylthiohydantoin covalent adduct in 15% yield, which was fully characterized by NMR and MS. Interestingly, the reaction of the unconjugated aldehyde with ethyl valinate, under similar experimental conditions, afforded the same phenylthiohydantoin covalent adduct. This result suggests that when the unconjugated aldehyde is formed *in vivo* it rapidly isomerizes to the thermodynamically more stable conjugated aldehyde which is the electrophilic intermediate responsible for the reaction with bionucleophiles, yielding covalent adducts that are believed to be at the onset of hypersensitivity reactions associated with the parent drug abacavir.

The phenylthiohydantoin covalent adduct was subsequently used as standard to monitor by LC-MS the formation of an *N*-terminal valine Hemoglobin (Hb) adduct upon modification with the conjugated standard, followed by reduction and *N*-alkyl Edman degradation. Incubation of abacavir with rat liver cytosol, followed by ethyl valinate addition, reduction and *N*-alkyl Edman degradation, also yielded this phenylthiohydantoin.

Our preliminary results suggest that abacavir metabolism to the 1''- carboxylate *via* an aldehyde intermediate could be a factor in the hypersensitivity reactions associated with abacavir administration. Furthermore, the abacavir adduct with the *N*-terminal valine of Hb, appears as an easily assessed marker of abacavir binding to proteins and a possible biomarker of abacavir toxicity.

Simbologias e Notações

Ac	Acetilo
Ar	Aromático
c.c.	Cromatografia em coluna
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.f.p.	Cromatografia em camada fina preparativa
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DCC	<i>N,N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
dG	2'-desoxiguanosina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMP	Periodinano de Dess-Martin
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	2,4-dinitrofenil-hidrazina
EM	Espectrometria de Massa
eq.	Equivalente
Et	Etilo
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	<i>Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride</i>
GSH	Glutathione
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
Hb	Hemoglobina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus type 2
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HSA	Albumina humana do soro
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>

^1H -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propilo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAP	<i>Leucine amino peptidase</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
NNRTI	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
m	Multipeto
$[\text{M}]^+$	Ião molecular
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation -- Time of Flight – Mass Spectrometry</i>
mRNA	RNA mensageiro
Me	Metilo
min.	minuto
Ms	Mesilo
m/z	Relação massa/carga
NMO	4-metilmorfolina- <i>N</i> -óxido
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NRTI	<i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NtRTIs	<i>Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
PCC	Clorocromato de piridínio
PDC	Dicromato de piridínio
PI	<i>Protease Inhibitor</i>
Py	Piridina
PVPCC	PCC em suporte polimérico
R _f	Factor de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
s	Singuleto
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
ppm	Partes por milhão
PBS	tampão fosfato salino
PTIC	Fenilisotiocianato
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoreto de tetrabutylamónio
^t Bu	<i>terc</i> -butilo

THF	Tetra-hidrofurano
TPAP	Perrutenato de tetrapropilamónio
t_R	Tempo de retenção
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
Val-OEt	Valinato de etilo
VIH	vírus da imunodeficiência humana
$\nu_{\text{máx}}$	Frequência do máximo de absorção em infravermelho
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano
η	Rendimento

Índice Geral

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 - O vírus da imunodeficiência humana	2
1.2 - Fármacos anti-virais	4
1.3 - O abacavir	9
1.3.1 - Metabolismo e Toxicidade	11
1.4 - Aduetos de proteínas como biomarcadores de toxicidade	15
1.5 - Métodos sintéticos para a oxidação de alcoóis a aldeídos	17
1.6 - Objectivos	22
Capítulo 2 - Discussão de Resultados	24
2.1 - Extracção e caracterização do composto activo do <i>Ziagen</i> ®	25
2.2 - Reacções de oxidação do abacavir para a formação dos metabolitos aldeídicos	28
2.2.1 - Reacção de oxidação com o clorocromato de piridínio e clorocromato de piridínio em suporte polimérico	28
2.2.2 - Reacção com o perrutenato de tetrapropilamónio	31
2.2.3 - Reacção com periodinano de Dess-Martin	33
2.2.4 - Reacção com dióxido de manganês (IV)	34
2.2.5 - Reacção de Swern	34
2.2.6 - Reacção com trióxido de enxofre e piridina	38
2.3 - Caracterização estrutural dos aldeídos conjugado (26) e não conjugado (25b)	39
2.4 - Reacção dos aldeídos derivados do abacavir com bionucleófilos	44
2.4.1 - Reacção com a lisina	45
2.4.2 - Reacção com a <i>N</i> -acetil-cisteína e com a glutatona	48
2.4.3 - Reacção com o valinato de etilo e com a Hemoglobina Humana	48
2.4.3.1 - Caracterização estrutural do aducto de Edman (50)	54
2.4.4 - Modificação da albumina do soro humano com o aldeído conjugado (26)	57
2.4.5 - Reacção com a 2'-desoxiguanosina	58
2.4.6 - Reacção de outros derivados do abacavir com bionucleófilos	58
2.5 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica de fígado de rato	61
2.6 - Conclusões	64
Capítulo 3 - Procedimento Experimental	66
3.1 - Preâmbulo	67
3.1.1 - Reagentes e Solventes	67
3.1.2 - Cromatografia em camada fina e cromatografia em coluna	68

3.1.3 - Cromatografia líquida de alta resolução	68
3.1.4 - Ressonância Magnética Nuclear	68
3.1.5 - Espectroscopia de infravermelho	69
3.1.6 - Espectrometria de massa	69
3.2 - Extração do [(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metanol (abacavir,) de comprimidos <i>Ziagen</i> ®	70
3.3 - Preparação de compostos derivados do abacavir	71
3.3.1 - Síntese do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il} metanol (<i>N</i> -acetil-abacavir, 44)	71
3.3.1.1 - Preparação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il} metoxi(terc-butildimetilsilano) (56)	71
3.3.1.2 - Preparação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il} metoxi(terc-butildimetilsilano) (57)	72
3.3.1.3 - Preparação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il} metanol (44)	72
3.3.2 - Reacções de formilação do abacavir	73
3.3.2.1 - Reacção com clorocromato de piridínio (PCC, 30) e clorocromato de piridínio em suporte polimérico (PVPCC)	73
3.3.2.2 – Reacção com complexo de trióxido de enxofre e piridina (Py.SO ₃ , 32)	74
3.3.2.3 – Reacção com perrutenato de tetrapropilamónio (TPAP, 39)	75
3.3.2.4 - Reacção com periodinano de Dess-Martin (DMP)	76
3.3.2.5 - Reacção com dióxido de manganês (IV) (MnO ₂ , 42)	76
3.3.2.6 - Reacção de Swern	76
3.3.2.6.1 - Ensaio para a optimização das condições experimentais	76
3.3.2.6.2 - Preparação do (<i>S</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (26)	78
3.3.2.6.3 - Preparação do (<i>S</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (25b)	79
3.3.3 - Reacção de formilação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il} metanol (44)	80
3.3.3.1 - Reacção com clorocromato de piridínio (PCC)	80
3.3.3.2 - Reacção de Swern	80
3.3.4 - Preparação do [(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2'-amino-6-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metil metanossulfonato (51)	81

3.3.5 - Ensaio para a preparação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il} clorometano (52)	82
3.4 - Preparação de aductos a partir de aldeídos derivados do abacavir.....	83
3.4.1. - Reacções com aminoácidos e péptidos.....	83
3.4.1.1 - Reacção com o valinato de etilo.....	83
3.4.1.1.1 - Método geral para a degradação de Edman	84
3.4.1.1.2 - Preparação do aducto de Edman (50).....	85
3.4.1.2 - Reacção com a lisina.....	87
3.4.1.3 - Reacção com a Fmoc-lisina.....	88
3.4.1.4 - Reacção com a <i>N</i> -acetil-cisteína	88
3.4.1.5 - Reacção com a glutationa (GSH).....	89
3.4.1.6 - Reacção com a 2'-desoxiguanosina (dG).....	89
3.4.2 - Reacção com a Hemoglobina Humana (Hb)	89
3.4.2.1 - Hidrólise da valina terminal por degradação de Edman	90
3.4.3 - Reacção com a Albumina do soro humano (HSA).....	91
3.4.3.1 - Hidrólise enzimática da HSA modificada com o aldeído conjugado 26.....	91
3.5 - Reacção de outros compostos derivados do abacavir com aminoácidos	91
3.5.1 - Reacção do [(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2'-amino-6-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metil metanossulfonato (51) com o valinato de etilo.....	91
3.5.2 - Reacção do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}metil metanossulfato (53) com o valinato de etilo	92
3.6 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica de fígado de rato.....	93
3.6.1 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica com o hidrocloreto de valinato de etilo	93
Capítulo 4 - Bibliografia.....	94

Índice de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática da estrutura e composição do HIV. Adaptado de [8].....	2
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo viral do HIV. Adaptado de [10].....	3
Figura 3 -	Estrutura de NRTIs aprovados pelo FDA: Zidovudina (1), Estavudina (2), Zalcitabina (3), Didanosina (4), Abacavir (5), Emtricitabina (6) e Lamivudina (7).....	5
Figura 4 -	Estrutura do Tenofovir disoproxil fumarato (8).....	6
Figura 5 -	Estruturas dos NNRTIs Nevirapina (9), Etravirina (10) e Efavirenz (11).....	6
Figura 6 -	Estrutura do PI Tipranavir (12).....	7
Figura 7 -	Estruturas de um antagonista dos co-receptores, o maraviroc (13) e de um inibidor de integrase o raltegravir (14), utilizados na terapia anti-HIV.....	8
Figura 8 -	Estrutura do sulfato de abacavir (<i>Ziagen</i> [®]).....	9
Figura 9 -	Metabólitos maioritários do abacavir: 1''-carboxilato (23) e 1''-glucuronido(24).....	12
Figura 10 -	Biomarcadores de efeito e de exposição, adaptado de [32].....	15
Figura 11 -	Estrutura do PDC (29) e do PCC (30).....	17
Figura 12 -	Estrutura do TPAP (39) e do NMO (40).....	19
Figura 13 -	Comparação entre os espectros de ¹ H-RMN (CDCl ₃) do abacavir extraído e do abacavir referência.....	25
Figura 14 -	Ampliação do espectro de HMBC do abacavir extraído, destacando-se as correlações a três ligações (H-C) dos sinais atribuídos aos prótons nas posições 1'' (a roxo) e 5 do anel de ciclopenteno (a azul).....	27
Figura 15 -	Espectro de HMBC do aldeído conjugado (26).....	42
Figura 16 -	Análise por LC-MS (ESI) da mistura reaccional da lisina modificada com o aldeído obtido por oxidação de Swern após tratamento com NaBH ₃ CN A. Representação esquemática da fragmentação, B. cromatograma iónico total da mistura reaccional, C. cromatograma iónico extraído (m/z 415) e D. espectro de massa do aducto com a lisina(48).....	46
Figura 17 -	Análise por LC-MS (ESI) da mistura reaccional do valinato de etilo modificado com o aldeído 26 obtido por oxidação de Swern após tratamento com NaBH ₃ CN A. Representação esquemática da fragmentação, B. cromatograma iónico total da mistura, C. cromatograma iónico extraído (m/z 414) e D. espectro de massa do aducto com o valinato de etilo (49).....	49
Figura 18 -	A. Representação esquemática da fragmentação do aducto de Edman (50). Cromatogramas iónicos obtidos por LC-MS ² (ESI) do ião m/z 503 de: B. mistura reaccional resultante da incubação do valinato de etilo com o aldeído conjugado (26); C. mistura reaccional resultante da incubação do valinato de etilo com o aldeído	

	conjugado (25a); D. produto isolado a $T_R=16$ min.; aducto padrão 50. F. espectro de massa dos produtos com $T_R= 11,29$ min. e $T_R= 16$ min. G. espectro de massa dos dois aductos, obtido por LC-MS ² (ESI) do ião m/z 503.....	52
Figura 19 -	Cromatogramas iônicos obtidos por LC-MS ² (ESI) do ião m/z 503 de: mistura reaccional da hemoglobina modificada com 30 min. (A) e 1 h (B) de incubação, após degradação de Edman; C. aducto padrão 50.....	54
Figura 20 -	Espectro de ¹ H-RMN do aducto de Edman (50).....	56
Figura 21 -	Ampliação do espectro de HMBC obtido para o aducto de Edman (50), destacando-se as correlações a 3 ligações (H-C) dos sinais atribuídos aos prótons na posição 1'' (a azul).....	57

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Etapas da activação celular do abacavir.	10
Esquema 2 - Síntese do abacavir (5).	11
Esquema 3 - Mecanismo de isomerização do metabolito 1''-carboxilato e do abacavir proposto por Walsh <i>et al.</i> ^[27]	13
Esquema 4 - Mecanismo envolvido na oxidação de Swern.	18
Esquema 5 - Esquem da reacção de formação do iodinano (38).	19
Esquema 6 - Mecanismo da reacção de oxidação de Oppenauer.	20
Esquema 7 - Mecanismo da reacção de oxidação com o reagente de <i>Fétizon</i>	21
Esquema 8 - Reacção de oxidação do álcool primário do abacavir para a formação do aldeído.	22
Esquema 9 - Mecanismo esperado para a oxidação do abacavir com o PCC (30).	30
Esquema 10 - Esquema reaccional para a preparação do <i>N</i> -acetil-abacavir (44).	31
Esquema 11 - Mecanismo esperado para a oxidação do abcavir com o TPAP, com regeneração do oxidante.	32
Esquema 12 - Esquema reaccional para a reacção a oxidação do abacavir com DMP, segundo o procedimento usual.	33
Esquema 13 - Esquema reaccional para a preparação do aldeído 25 por oxidação de Swern.	35
Esquema 14 – Mecanismo proposto para a formação do aldeído α,β -insaturado 26.	36
Esquema 15 – Esquema reaccional da formação de aductos com bionucleófilos de azoto pelo mecanismo de base de Schiff (a) ou por adição de Michael (b).	45
Esquema 16 - Esquema reaccional dos passos reaccionais para a formação do aducto sob a forma de hidantoína.	50
Esquema 17 - Esquema reaccional para a formação do aducto com o valinato de etilo por um mecanismo S_N2	59
Esquema 18 - Mecanismo proposto para a formação do {(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9 <i>H</i> -purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il} metil metanossulfato (53).	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos nos ensaios da oxidação do abacavir pelo método de Swern.....	37
Tabela 2 - Dados espectroscópicos obtidos para o abacavir e para os aldeídos 26 e 25b.	40
Tabela 3 - Condições experimentais dos ensaios da reacção para a formação do aducto com o valinato de etilo após degradação de Edman.	51
Tabela 4 - Condições experimentais e tratamento das misturas reaccionais obtidas nos ensaios entre o abacavir (5) e o PCC (30).	73
Tabela 5 - Condições experimentais e tratamento das misturas reaccionais obtidas nos ensaios entre o abacavir (5) e o PVPCC.....	74
Tabela 6 - Condições Condições experimentais dos ensaios entre o abacavir (5) e o TPAP (39).	75
Tabela 7 - Condições experimentais dos ensaios entre o abacavir (5) e o DMP (37).	76
Tabela 8 - Condições experimentais e resultados obtidos nos ensaios da reacção de Swern.....	77
Tabela 9 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados na reacção do hidrocloreto de valinato de etilo com as misturas reaccionais, obtidas na oxidação do abacavir pelo método de Swern.	83
Tabela 10 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com o hidrocloreto de valinato de etilo, a partir de 26 e 25b	84
Tabela 11 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com a <i>N</i> -acetil-cisteína.	88
Tabela 12 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com a 2'-desoxiguanosina, a partir de misturas reaccionais.	89
Tabela 13 - Condições experimentais dos ensaios da modificação da Hb com o aldeído conjugado (26)	90

Capítulo 1 - Introdução

1.1 - O vírus da imunodeficiência humana

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou HIV (do inglês *human immunodeficiency virus*), causador da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é umas das mais preocupantes epidemias a nível mundial, tornando a descoberta de novos fármacos um desafio fundamental não só no presente como no futuro. A estimativa feita para o ano de 2008 apontava para 33,4 milhões de pessoas infectadas pelo vírus, que emergiu nos anos 80. ^[1] Embora o número de infectados tenha aumentado desde essa década a esperança média de vida dos doentes é também superior, em grande parte devido à eficácia da terapia antiretroviral altamente activa ou HAART (do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), sendo actualmente considerada uma doença crónica em países desenvolvidos. ^[2]

O HIV é um *lentivirus* (vírus lento) que pertence ao grupo dos retrovírus. Existem dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2. Ambos têm o mesmo modo de transmissão e estão associados à SIDA e a infecções oportunistas, no entanto a infecção por HIV-2 desenvolve-se mais lentamente. Destes dois tipos conhecidos o HIV-1 prevalece em 99% das infecções. ^[3, 4]

O HIV é um vírus de *single-stranded* RNA (ssRNA) que apresenta uma estrutura esférica e é composto por duas cópias do seu genoma aos quais estão associadas a enzima transcriptase reversa e a integrase, proteínas que estão envolvidas na replicação do DNA viral que é depois integrado na célula hospedeira. Este agregado de ácido nucleico mais proteínas encontra-se dentro da cápside, uma proteína viral p24, que é envolvida por uma matriz composta por proteína viral p17. Esta matriz é rodeada pelo envelope viral que é composto por uma membrana dupla fosfolipídica com glicoproteínas na superfície (gp41 e gp120), responsáveis pela ligação aos co-receptores da célula hospedeira, ^[5-8] (Figura 1).

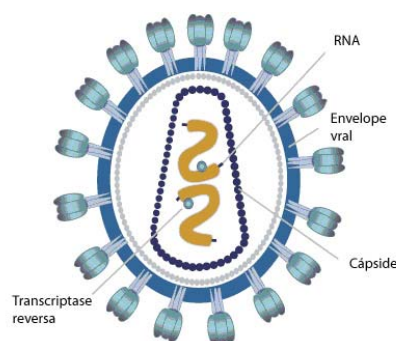


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura e composição do HIV. Adaptado de [8].

A infecção pelo HIV consiste, em primeiro lugar na ligação do vírus aos receptores CD4 da célula hospedeira, através das glicoproteínas gp120 que envolvem o envelope viral. Esta ligação provoca alterações conformacionais que permitem a entrada do envelope viral na

célula hospedeira e a sua fusão com a membrana celular. Segue-se a libertação da cápside para o meio intracelular, permitindo o contacto entre o RNA viral e o citoplasma celular. Neste estado do ciclo viral, é a transcriptase reversa que catalisa a transcrição do RNA viral numa cadeia dupla de DNA viral, que é depois integrado, pela integrase, no genoma da célula hospedeira. Quando se dá a replicação do DNA modificado, e a transcrição em mRNA são utilizadas tanto as proteínas virais como a maquinaria da célula hospedeira. Durante este processo ocorre a formação de duas cópias de ssRNA viral que são incorporadas num novo complexo viral, que cresce para fora da célula, levando parte da membrana celular hospedeira. Através da acção de proteases virais o novo complexo viral sai da célula hospedeira, para amadurecer, completando assim o ciclo viral, [2, 5, 7, 9] (Figura 2).

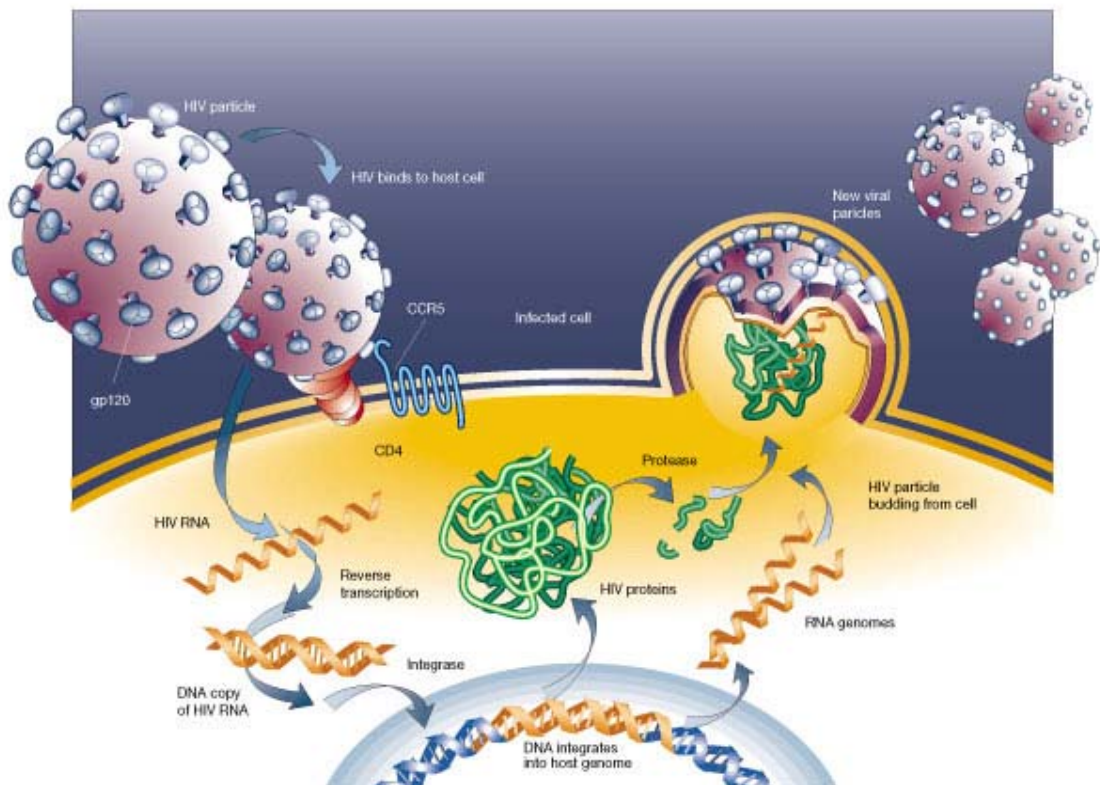


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo viral do HIV. Adaptado de [10].

O principal alvo do HIV é o sistema imunitário, especificamente as glicoproteínas CD4 de células T. [11] Após a entrada do vírus na corrente sanguínea, por via sexual, através do sangue ou derivados sanguíneos ou a partir de transmissão vertical (de mãe para filho), [12] ocorre a replicação rápida do vírus. Durante esta fase, que pode durar entre 2 a 4 semanas, os doentes já apresentam alguns sintomas, que muitas vezes não evidenciam a infecção pelo

vírus. Segue-se um período de latência, cuja duração depende de doente para doente, em média de 8-11 anos. Nesta fase é possível detectar o aumento da resposta imunitária e os sintomas ocorrentes podem ser mais severos. O aumento do número de células T CD4⁺ pode, em raros casos, levar mais de 6 meses a ocorrer, portanto os testes de HIV são repetidos após possível contacto com o vírus.^[13]

Quando o balanço entre a destruição das células alvo e a produção de células imunológicas é alterado existe uma perda tanto na mediação celular como na imunidade humoral. A falha do sistema imunitário leva à ocorrência da SIDA,^[13] o período final da infecção caracterizada por sintomas de várias doenças oportunistas (infecciosas e tumorais), que são a maior causa de morbilidade e mortalidade entre os indivíduos infectados com HIV-1.^[12, 13]

Actualmente não existe cura para esta doença e torna-se evidente que a descoberta de uma vacina contra o HIV-1 seria o fim da epidemia causada. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficiente apresenta muitos desafios para os investigadores. Os requisitos necessários passam tanto pela imunidade celular como pela imunidade humoral.^[14] As estratégias para a criação de uma vacina passam pela utilização de células responsáveis pela destruição das células infectadas pelo vírus; no entanto por esta via não se elimina ou previne a infecção pelo vírus. Por outro lado os investigadores avançam com uma via promissora, com a utilização de anti-corpos capazes de prevenir eficazmente a infecção;^[15] contudo a dificuldade em criar um imunogénio capaz de gerar o anti-corpo prevalece.^[14,16] Assim sendo, o único método actual para prevenir a infecção pelo HIV é evitar a exposição.

1.2 - Fármacos anti-virais

Durante os últimos 20 anos o desenvolvimento de fármacos anti-HIV é tema de inúmeros projectos de investigação. O tratamento com uma combinação destes fármacos conduz à diminuição da morbilidade e mortalidade dos doentes, não obstante tratar-se ainda assim de uma doença complexa. Os avanços feitos têm sido bem sucedidos e existem já mais fármacos aprovados pela organização *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento do HIV, do que para qualquer outra infecção viral. O mecanismo de acção destes fármacos deve ter como princípio a ligação às proteínas virais ou às proteínas celulares, de modo a inibir a acção de proliferação do vírus e infecção de novas células. Segundo a FDA, existem vários grupos de anti-virais que são classificados como: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleósidos/nucleótidos ou NRTIs/NtRTIs (do inglês *Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors*); inibidores da transcriptase reversa

não análogos de nucleósidos/nucleótidos ou NNRTIs (do inglês *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*); inibidores de protease ou PIs (do inglês *Protease Inhibitors*); inibidores da penetração viral; inibidores da integrase; inibidores de co-receptor. As estratégias para a terapia antiviral estabeleceram-se de acordo com uma possível intervenção num determinado passo do ciclo viral. ^[17]

Em 1987 surgiu o primeiro fármaco anti-HIV, aprovado para o tratamento da SIDA, a zidovudina (**1**, Figura 3). ^[17] Este fármaco pertence à classe dos NRTIs, um análogo de nucleósido e funciona como inibidor da transcriptase reversa, a proteína responsável pela formação do DNA viral. Os NRTIs são pró-fármacos, sofrendo inicialmente a acção de cinases, enzimas da célula hospedeira que os metabolizam através de três passos de adição de grupos fosfato. Na sua forma activa, estes fármacos competem com nucleótidos necessários para a síntese do DNA viral. ^[18]

Existem mais seis NRTIs aprovados pela FDA cujas estruturas estão apresentadas na Figura 3. ^[2]

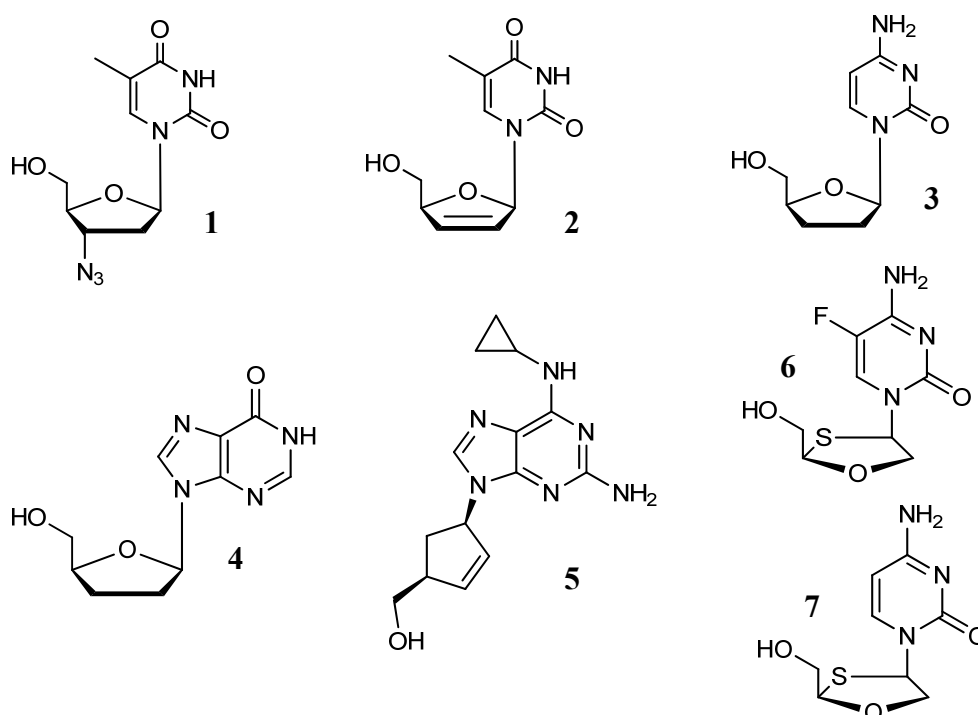


Figura 3 - Estrutura de NRTIs aprovados pelo FDA: Zidovudina (1), Estavudina (2), Zalcitabina (3), Didanosina (4), Abacavir (5), Emtricitabina (6) e Lamivudina (7).

Os NtRTIs têm um modo de acção semelhante aos análogos de nucleósidos mas a presença do grupo fosfato implica apenas dois passos de fosforilação para a sua activação. O tenofovir disoproxil fumarato (**8**, Figura 4) é o único NtRTI actualmente indicado no tratamento do HIV-1. [2]

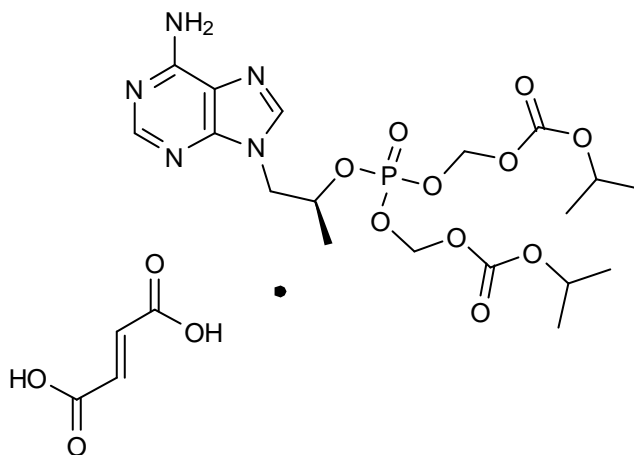


Figura 4 - Estrutura do Tenofovir disoproxil fumarato (**8**).

Os NNRTIs, que começaram a ser utilizados na terapia anti-HIV entre 1989 e 1990, são também inibidores da transcriptase reversa mas com um mecanismo de acção diferente do tipo de fármacos descritos anteriormente. Os NNRTIs actuam ao nível do centro alostérico da proteína, através de interacções com os aminoácidos aromáticos. O mecanismo de acção é não competitivo, o fármaco não se liga ao centro catalítico da enzima, porém a proximidade dos dois centros provoca alterações conformacionais na estrutura tridimensional da proteína que, limitam a sua actividade e inibem a transcrição do RNA viral. Exemplos de NNRTIs utilizados actualmente na terapia anti-HIV são a nevirapina (**9**), a etravirina (**10**) e o efavirenz (**11**, Figura 5). [2]

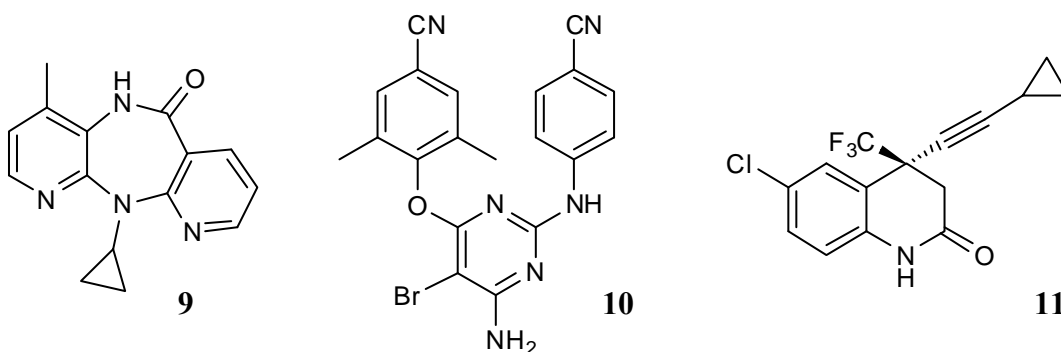


Figura 5 - Estruturas dos NNRTIs Nevirapina (**9**), Etravirina (**10**) e Efavirenz (**11**).

Os PIs são fármacos que actuam na fase final de replicação do vírus, impedindo a activação de novos complexos virais, através da inibição da actividade das proteases. Geralmente devido à sua estrutura, estes fármacos são considerados peptidomiméticos, ou seja contêm um grupo hidroxietileno que substitui a ligação peptídica duma das proteínas que a protease vai clivar em proteínas da cápside maduras e enzimas. ^[18] Para além de fármacos baseados na estrutura de péptidos apresentarem problemas de biodisponibilidade existe ainda o clássico problema da resistência criada pelo vírus a este tipo de fármacos. A ineficácia destes fármacos promoveu a procura de inibidores de proteases com estruturas diferentes das baseadas em péptidos. O tipranavir (**12**, Figura 6) é um exemplo deste tipo de fármacos. ^[2]

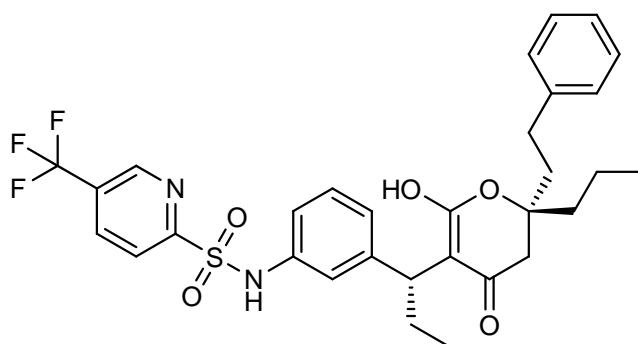


Figura 6 - Estrutura do PI Tipranavir (12).

Os inibidores da fusão do HIV com a célula hospedeira são um tipo de fármacos que têm como alvo o receptor da membrana celular ao qual se vai ligar o vírus ou as proteínas virais. Os inibidores que se ligam a proteínas virais são péptidos que vão alterar a afinidade da proteína para o receptor. ^[2]

Os antagonistas dos co-receptores celulares bloqueiam a ligação do vírus à célula e consequentemente a sua entrada na célula hospedeira. O maraviroc (**13**) é um exemplo de um fármaco deste tipo, (Figura 7). ^[2]

Os inibidores da integrase, inibem a proteína responsável pela reacção de transferência da cadeia de DNA no processo de integração, que é um passo crucial na manutenção estável do genoma viral, assim como na expressão e replicação viral eficaz. A integrase é considerada um alvo muito promissor para o tratamento anti-HIV. Entre os fármacos que actuam a este nível encontra-se o raltegravir (**14**, Figura 7). ^[2]

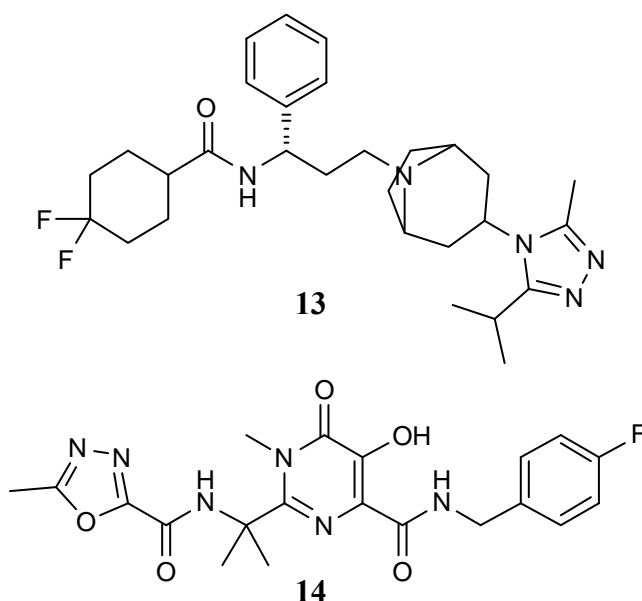


Figura 7 - Estruturas de um antagonista dos co-receptores, o maraviroc (13) e de um inibidor de integrase o raltegravir (14), utilizados na terapia anti-HIV.

A introdução da terapia antiretroviral altamente activa ou HAART (do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*) em meados de 1990, diminuiu significativamente a morbidez e mortalidade dos doentes infectados com o HIV. O tratamento consiste numa combinação de três fármacos pertencendo a pelo menos duas classes diferentes de agentes antiretrovirais. A aplicação desta estratégia terapêutica prevaleceu sobre a monoterapia, revelando maior eficácia no tratamento dos doentes. ^[2]

Na medida em que a erradicação completa do vírus HIV parece improvável num futuro próximo, o tratamento crónico actualmente recomendado com a HAART é inevitável. No entanto, os efeitos adversos associados à exposição crónica à HAART têm merecido especial preocupação, tornando-se clara a necessidade de avaliar os efeitos desta exposição. Neste contexto, o conhecimento dos mecanismos de toxicidade dos fármacos actuais é determinante para a minimização dos riscos e para o desenvolvimento de fármacos menos tóxicos e com outros mecanismos de interacção. ^[2],18]

1.3 - O abacavir

O abacavir, [(1*S*,4*R*)-4-(2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metanol (**5**), (Figura 3) é uma purina substituída no carbono 6' com um grupo ciclopropilo. Sendo o estereoisómero com configuração absoluta 1*S* e 4*R* nos dois centros quirais do ciclopenteno, pertence ao grupo dos fármacos anti-HIV inibidores da transcriptase reversa. Este NRTI, que foi aprovado para o tratamento de doentes infectados com o HIV em 1999, ^[19] está comercialmente acessível sob a forma de sulfato de abacavir, com o nome de Ziagen[®] (Figura 8) e é usado tanto no tratamento de adultos como de crianças.

A administração do abacavir na forma de sulfato (Ziagen[®]) está indicada no tratamento da infecção pelo HIV-1 e pode ser feita com a toma de comprimidos ou de uma solução oral. Para adultos a dose recomendada de comprimidos é de 600 mg, por dia ou repartida em duas doses diárias, em combinação com outros fármacos anti-HIV. Relativamente à solução oral a administração recomendada para crianças com 3 meses ou mais, é de 8 mg/kg, duas vezes por dia (no máximo 300 mg duas vezes por dia) em combinação com outros fármacos anti-HIV. O abacavir é rapidamente absorvido após administração oral e apresenta uma biodisponibilidade de 83% (para uma dose de 300 mg ,duas vezes por dia). ^[20]

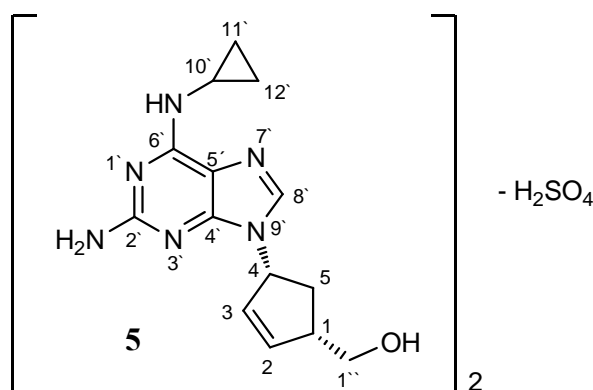
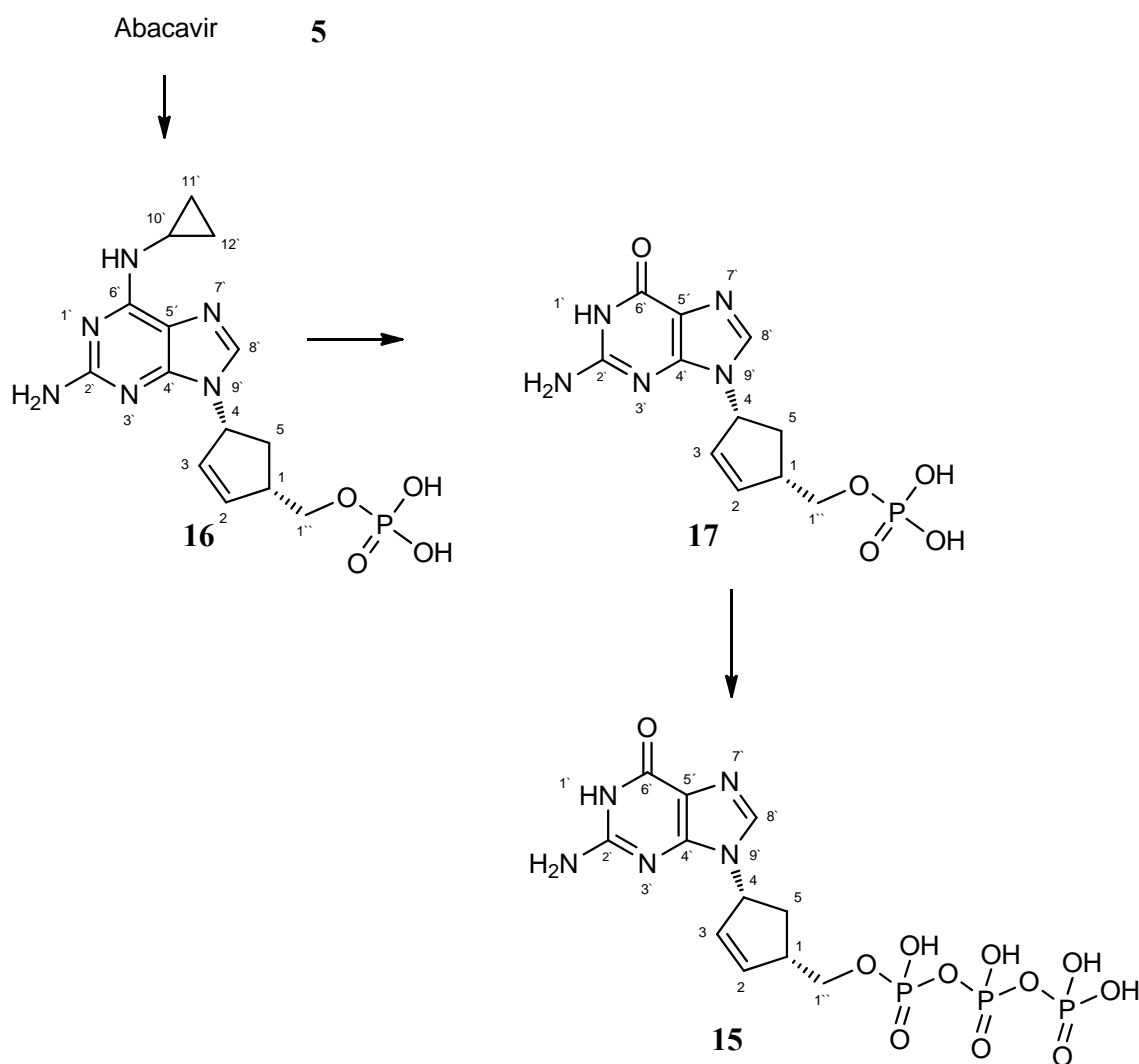


Figura 8 - Estrutura do sulfato de abacavir (Ziagen[®]).

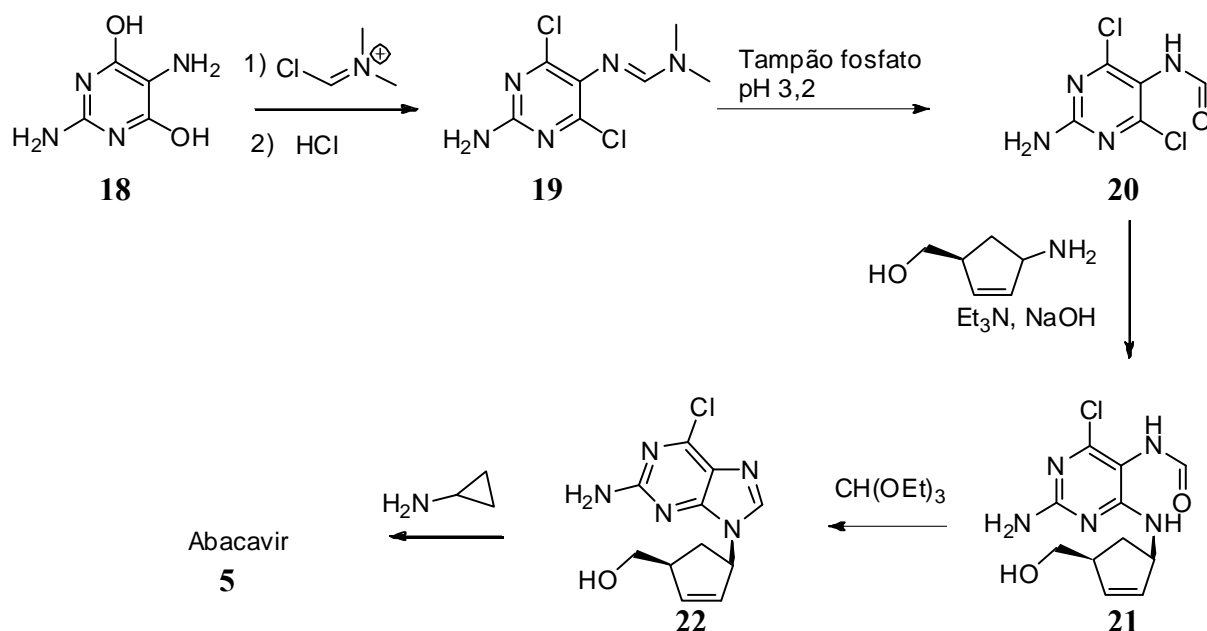
O sulfato de abacavir é um pró-fármaco que se dissocia, sob a forma de base livre, sendo posteriormente convertido, por enzimas celulares, no metabolito activo no tratamento do HIV, o carbovir trifosfato (**15**, Esquema 1). ^[20] Para que este processo de activação metabólica ocorra, o abacavir entra nas células, através de difusão lenta e liga-se às proteínas citosólicas. Uma vez dentro da célula é transformado em abacavir 1''-monofosfato (**16**, Esquema 1) pela adenosina fosfotransferase. Posteriormente, por acção de enzimas citosólicas

forma-se o (-)-carbovir-1''-monofosfato (**17**, Esquema 1) que finalmente por fosforilação catalisada por cinases dá origem ao metabolito activo o carbovir trifosfato (**15**). Este análogo do trifosfato de desoxiguanosina vai inibir a acção da transcriptase reversa através de competição e incorporação no RNA viral. A inexistência de um substituinte hidroxilo no anel de 5 membros faz com que a cadeia de DNA viral termine devido à impossibilidade de formação das ligações fosfodiéster, necessárias na formação da cadeia de DNA. [21], [22]



Esquema 1 - Etapas da activação celular do abacavir.

O Ziagen[®] é fabricado pela farmacêutica GlaxoSmithKline por um processo sintético (Esquema 2) que se inicia com o tratamento da pirimidina **18** com cloreto de *N*-clorometileno-*N,N*-dimetilamónio dando origem à dicloropirimidina **19**. Posteriormente é hidrolisado para formar a formamida **20**. Ao composto obtido é adicionado o (1*S*,4*R*)-4-amino-2-ciclopenten-1-metanol, na presença de trietilamina e NaOH obtendo-se **21**, cuja ciclização, seguida de reacção com cilopropilamina resulta na formação do abacavir (**5**). [23], [24]



Esquema 2 - Síntese do abacavir (5).

1.3.1 - Metabolismo e Toxicidade

Apesar da eficácia do abacavir, quando comparado com outros NRTIs, as reacções de hipersensibilidade são um sério efeito adverso associado a este fármaco. Estas reacções envolvem sintomas como febre, alterações de cor ou textura da pele, irritações cutâneas sérias, alterações gastrointestinais (náusea, vômito ou dor abdominal), fadiga e problemas respiratórios que podem ocorrer nas 6 semanas seguintes à administração do fármaco. ^[20] Os casos de hipersensibilidade ao abacavir, têm uma incidência de 8%, sendo que o primeiro foi reportado em 2001. ^[19]

As reacções de hipersensibilidade representam o factor de toxicidade mais limitante no tratamentos do HIV com abacavir, uma vez que este efeito adverso pode causar a morte, caso não seja descontinuado o uso do fármaco. Assim é notória a necessidade de prever estes casos. A relação entre a reacção de hipersensibilidade ao abacavir e factores genéticos foi evidenciada desde cedo através de observações clínicas que mostravam a prevalência dos sintomas em doentes caucasianos ou com familiares caucasianos. Visto que a frequência do complexo HLA-B*5701 está relacionada com a raça das pessoas, foi possível desenvolver testes primários para

identificação do risco associado ao abacavir. ^{[19], [25]} Desde 2008 que a FDA considera o exame pré-clínico como prática corrente na avaliação do método anti-HIV a aplicar, de modo a prevenir casos graves de hipersensibilidade ao abacavir. ^{[20], [26]}

Para além da existência de uma relação entre a presença do alelo HLA-B*5701 e o desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade ao abacavir, o envolvimento da bioactivação deste fármaco a metabolitos electrófilos poderá também estar na origem destes eventos tóxicos. Efectivamente, tal como acontece com outros xenobióticos, a metabolização do abacavir pode levar à formação de metabolitos secundários reactivos susceptíveis de reagirem com as biomacromoléculas (ex. DNA e proteínas) formando aductos covalentes, que podem estar na génese dos eventos tóxicos associados ao abacavir. ^[27]

Os metabolitos maioritários do abacavir são o 1''-carboxilato (**23**) e 1''-glucuronido (**24**), (Figura 9) formados sob acção das enzimas álcool desidrogenase (Fase I) e uridina difosfato glucuroniltransferase (Fase II). A eliminação do abacavir resulta na excreção de 2% do mesmo, não modificado e dos dois metabolitos maioritários, o 1''-carboxilato (30%) e o 1''-glucurónido (36%). Aproximadamente 15% da dose administrada é composta por metabolitos minoritários que até hoje não mostraram qualquer relevância como potenciais metabolitos reactivos. ^[28]

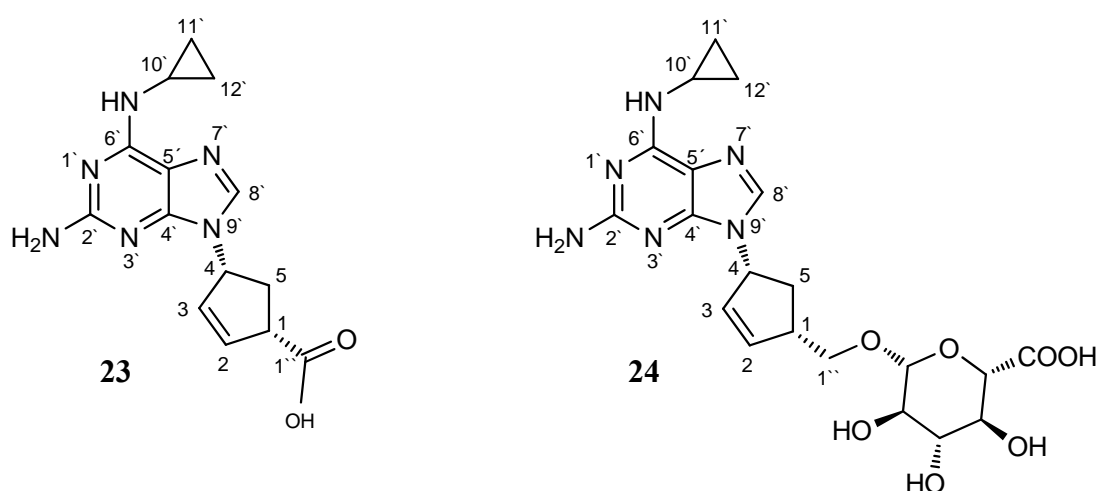


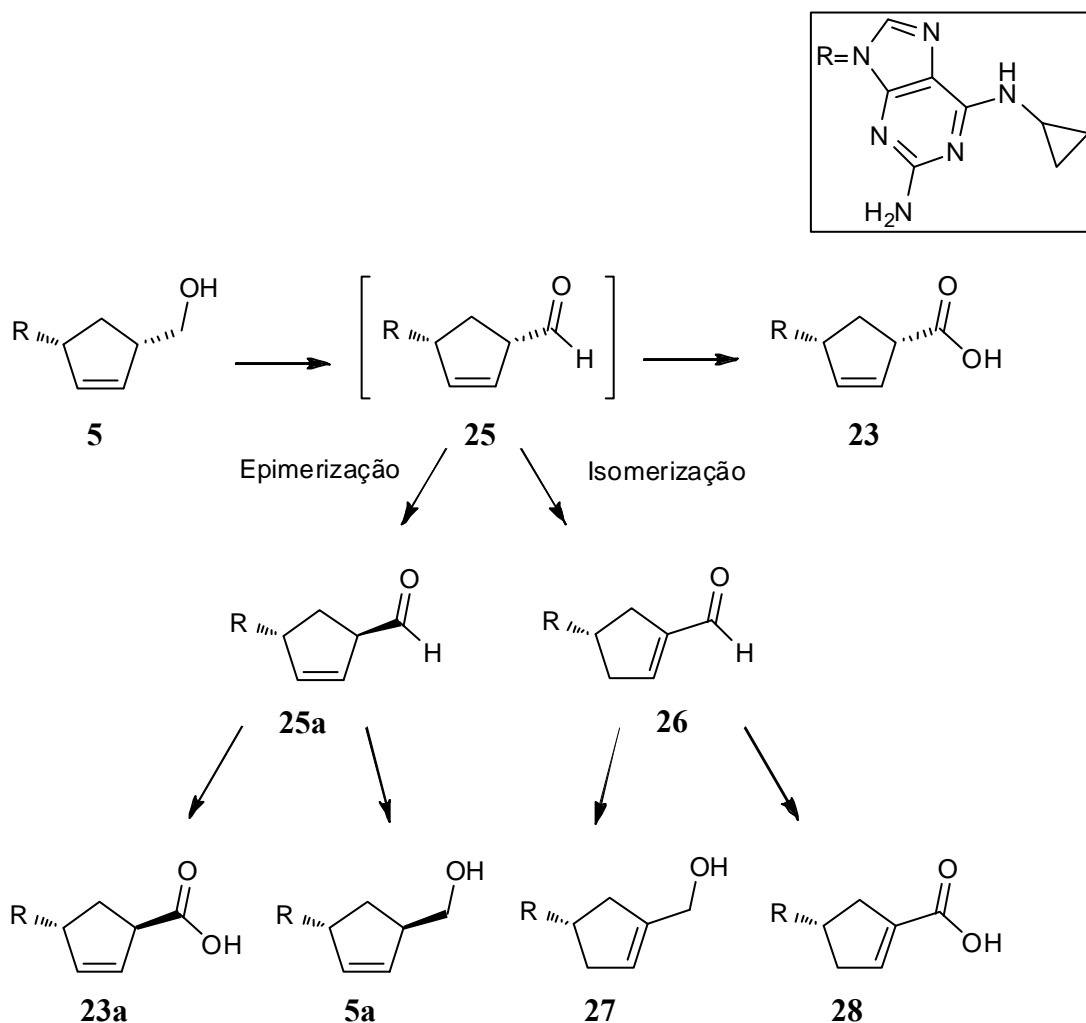
Figura 9 - Metabolitos maioritários do abacavir: 1''-carboxilato (23) e 1''-glucuronido (24).

A formação do metabolito 1''-carboxilato (**23**) envolve dois passos de oxidação através de um aldeído precursor (**25**), (Esquema 3). Apesar de nunca ter sido observado directamente como metabolito do abacavir, devido ao insucesso nas tentativas para a preparação de padrões deste metabolito, a sua formação foi provada indirectamente, tendo sido armadilhado sob a forma de uma oxima, em incubações com diferentes isoformas de álcool desidrogenases humanas. É plausível que este intermediário electrófilo seja responsável pela toxicidade associada ao abacavir, uma vez que a reactividade e a capacidade de se ligarem covalentemente

a proteínas foram já identificadas para um grande número de aldeídos provenientes do metabolismo de outros fármacos.^[27]

Em ensaios *in vitro*, realizados com diferentes isoformas de álcool desidrogenases humanas verificou-se a existência de isômeros tanto do abacavir (**5**) como do metabolito 1''-carboxilato (**23**), que inclusive já tinham sido observados como metabolitos minoritários na análise de urina humana, em ensaios realizados com abacavir marcado isotopicamente. A oxidação enzimática de alcoóis primários leva à formação de isômeros por processos de epimerização e isomerização da ligação dupla, que ocorrem a partir do aldeído intermediário (**25**). Como resultado, obtém-se um estereoisômero e um isômero estrutural do abacavir (**5a** e **27**, respectivamente), o mesmo acontecendo para o metabolito 1''-carboxilato (**23a** e **28**, respectivamente) (Esquema 3).^[27]

Walsh *et al.*^[27] atribuem a possibilidade de formação de aductos do tipo fármaco-proteína através de dois mecanismos possíveis com o metabolito aldeídico (**25**, **25a** e **26**): por formação de base de *Schiff* ou por adição 1,4 no caso da formação de um aldeído do tipo aceitador de *Michael* como o metabolito **26**.



Esquema 3 - Mecanismo de isomerização do metabolito 1''-carboxilato e do abacavir proposto por Walsh *et al.*^[27].

Como já foi referido a reacção de oxidação do ácido passando pelo aldeído como intermediário é catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Existem estudos que comprovam o envolvimento desta enzima na oxidação do abacavir, ao nível de tecidos epitéliais e do fígado. A inibição da enzima álcool desidrogenase por parte do 4-metilpirazole (inibidor competitivo desta enzima) anula a resposta ao abacavir do complexo HLA-B*5701, um gene envolvido na formação de proteínas do sistema imunitário. Presume-se então que a ausência de resposta surge devido à inibição da acção da enzima álcool desidrogenase na formação dos metabolitos responsáveis pela reacção de hipersensibilidade ao abacavir. [26], [29]

1.4 - Adutos de proteínas como biomarcadores de toxicidade

A biotransformação de xenobióticos nem sempre resulta num processo de destoxificação com consequente excreção. Muitas vezes a metabolização de xenobióticos resulta na activação, com um aumento da toxicidade relativamente ao composto inicial, devido à formação de metabolitos reactivos. Estes metabolitos são normalmente espécies electrófilas que reagem facilmente com biomacromoléculas (DNA ou proteínas) formando adutos covalentes que poderão estar na génese de reacções tóxicas. ^[30]

A monitorização de adutos deste tipo torna-se importante para avaliar a eficácia e a toxicidade associada a fármacos. Sendo considerados biomarcadores de exposição, a importância dos metabolitos e dos adutos formados caracteriza-se pelo facto da sua monitorização possibilitar a compreensão do metabolismo em diferentes espécies e o efeito na estabilidade química e na reparação do DNA, (Figura10). ^{[30], [31]}

A utilização de adutos de proteínas como biomarcadores apresenta algumas vantagens, relativamente aos adutos de DNA tais como: fácil acessibilidade e obtenção em grande escala, cinéticas conhecidas e ausência de sistemas de reparação celular que possam remover os adutos formados. ^[32]

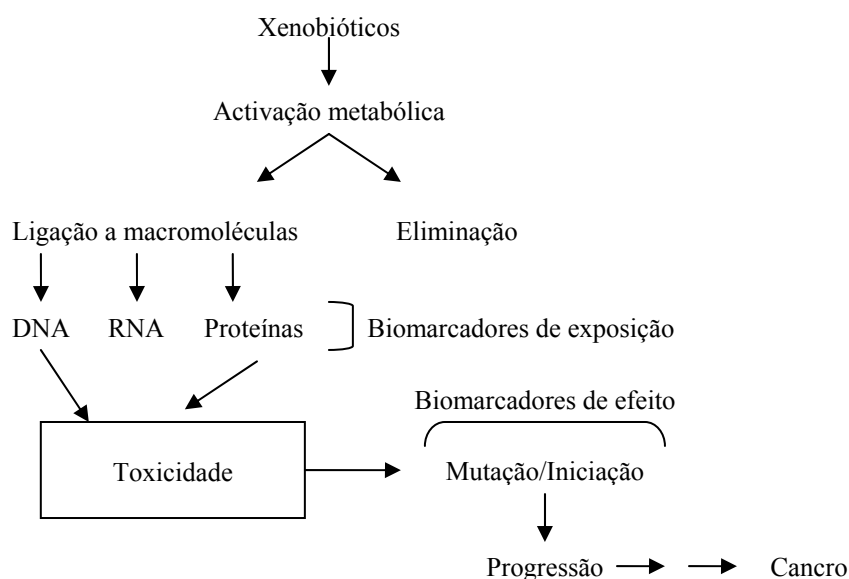


Figura10 - Biomarcadores de efeito e de exposição, adaptado de [32].

Nas últimas décadas a relação entre a formação de adutos com proteínas, por metabolitos reactivos de espécies endógenas ou exógenas e os efeitos na toxicidade, têm sido o foco de um grande número de estudos. ^[30] Tal facto deve-se em muito ao progresso em metodologias analíticas de alta sensibilidade, particularmente em espectrometria de massa. ^[33]

As técnicas analíticas de LC-MS são as mais utilizadas para a análise e quantificação de aductos com proteínas, por aliarem o poder de separação de misturas complexas ao poder de caracterização estrutural da espectrometria de massa. ^[34] No entanto outras técnicas como o GC-MS ou o MALDI-TOF-MS são também utilizadas para a análise destes biomarcadores. ^[33]

Actualmente, os aductos de proteínas são amplamente estudados como biomarcadores de exposição a agentes cancerígenos e alergénicos. As proteínas de eleição para os estudos de formação de aductos são as proteínas do sangue, a HSA (albumina humana do soro) e a Hb (hemoglobina), proteínas abundantes, cujo tempo de meia vida é conhecido. Apesar da HSA apresentar um menor tempo de meia vida relativamente à Hb, 40% da HSA extravascular está na pele, tornando-se muito importante como biomarcador em estudos relacionados com alergias ao nível dos tecidos epiteliais. A Hb, para além de ter um tempo de meia vida longo, quando forma aductos, os intermediários reactivos têm de passar a membrana celular para chegar à proteína. Assim estes aductos com a Hb mimetizam os aductos de DNA, sendo considerados bons substitutos nos estudos dos compostos cancerígenos e genotóxicos. ^[33]

A modificação da HSA por agentes electrófilos resulta na formação de aductos com diversos resíduos nucleófilos, incluindo a cisteína, a lisina e a histidina. ^[35] No caso da hemoglobina, para além da possibilidade de formação de aductos nos resíduos nucleófilos (ex. cisteína e lisina), os átomos de azoto- α dos resíduos *N*-terminais da valina da Hb humana A e B são também locais nucleófilos, capazes de reagir com vários electrófilos. ^[33]

Os produtos formados podem ser analisados após hidrólise da proteína. A degradação de Edman é um processo de clivagem selectiva dos aductos formados com as valinas terminais da Hb que envolve a formação de feniltioidoínas. Este método foi inicialmente desenvolvido para a análise por GC-MS recorrendo à derivatização com o fenilisotiocianato fluorado. No entanto, uma vez que nem todos os aductos são volatilizáveis desta forma, o fenilisotiocianato (PTIC) é actualmente muito utilizado como agente derivatizante para a análise por LC-MS de aductos com as valinas terminais da Hb. ^[36] O método mais utilizado para a análise dos restantes aductos recorre inicialmente à hidrólise enzimática a péptidos (ex. com a tripsina) ou à hidrólise a aminoácidos, (ex. uso conjunto de pronase E e leucina aminopeptidase) seguida de análise dos aductos libertados por LC-MS, por comparação com padrões pré-preparados. ^{[33], [34], [37]}

A simplicidade no isolamento e monitorização dos aductos fármaco-proteína faz com que sejam um alvo promissor na percepção dos mecanismos de toxicidade em xenobióticos.

1.5 - Métodos sintéticos para a oxidação de alcoóis a aldeídos

A oxidação é uma das reacções fundamentais para interconversão de grupos funcionais em síntese orgânica. A obtenção de aldeídos a partir de alcoóis primários ocorre por desidrogenação do reagente de partida. Existem vários métodos descritos para esta transformação. No entanto, o tipo de álcool, a presença de outros grupos funcionais na molécula e a possibilidade de ocorrência de produtos secundários condicionam a escolha do método de oxidação. Não o pretendendo fazer de forma exaustiva, de seguida serão descritos sucintamente os métodos mais utilizados para a oxidação de alcoóis a aldeídos.

A. Oxidação com reagentes de crómio (VI)

O trióxido de crómio (CrO_3) é um oxidante potente sendo frequentemente utilizado na oxidação de compostos orgânicos. No entanto, as condições mais amplamente utilizadas na oxidação de alcoóis com este reagente, que envolvem a adição de uma solução de H_2SO_4 , com obtenção do ácido crómico (reagente de Jones), não são as adequadas para a oxidação de alcoóis primários a aldeídos. Uma vez que a reacção ocorre em meio aquoso forma-se o hidrato do aldeído que é prontamente oxidado ao ácido. Porém o tratamento adequado do reagente de Jones ou do CrO_3 com piridina, leva à formação dos complexos dicromato de piridínio (PDC, **29**) e clorocromato de piridínio (PCC, **30**), (Figura 11) reagentes estes que possibilitam a ocorrência de reacções em meio orgânico (na ausência de água) permitindo a oxidação de alcoóis primários a aldeídos sem sobre-oxidação ao ácido carboxílico. [38]

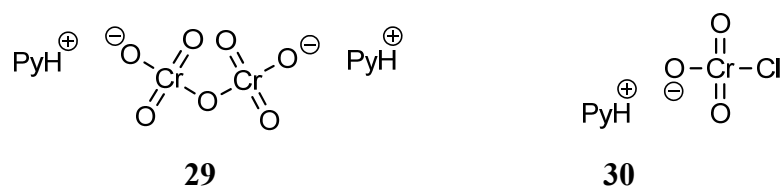


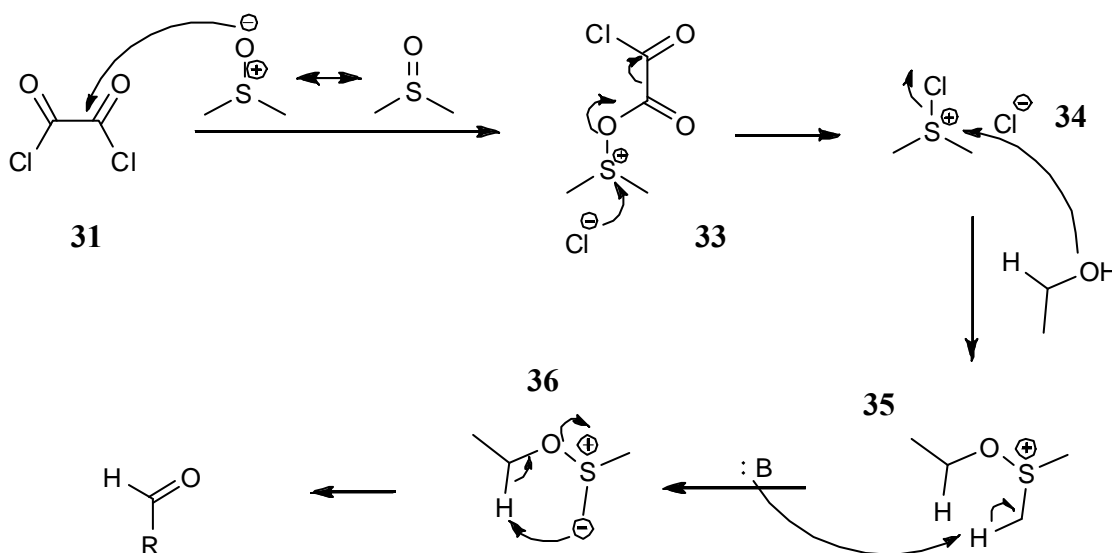
Figura 11 - Estrutura do PDC (**29**) e do PCC (**30**).

B. Oxidação com dimetilsulfóxido ativado

A activação da molécula de dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser efectuada pela adição a electrófilos como a *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), o cloreto de oxalilo (**31**), o anidrido trifluoroacético, anidrido acético ou o complexo de trióxido de enxofre e piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$, **32**). Uma vez activado o enxofre é reduzido a sulfureto enquanto o álcool é oxidado a aldeído. O electrófilo utilizado nestes métodos de oxidação depende essencialmente da

reactividade do álcool e das condições reaccionais (temperatura e solventes). No entanto, actualmente a utilização de cloreto de oxalilo como electrófilo, conhecida como a oxidação de Swern, é o método *standard*, mais vulgarmente utilizado em oxidações envolvendo DMSO activado (**34**), por permitir elevados rendimentos de conversão com diferentes substratos utilizando condições muito suaves, incluindo baixa temperatura. ^[38]

A oxidação de alcoóis por esta via envolve a reacção do cloreto de oxalilo (**31**) com o DMSO para formar um catião sulfónio (**33**), com um bom grupo de saída ligado ao átomo de enxofre dando origem ao DMSO activado (**34**, Esquema 4). O ataque do álcool ao átomo de enxofre electrodeficiente resulta num sal alcoxidimetilsulfónio **35** que perde um protão para a formação do íleto de enxofre (**36**). Por fim a eliminação intramolecular resulta na formação do aldeído e do dimetil sulfureto. ^[38]

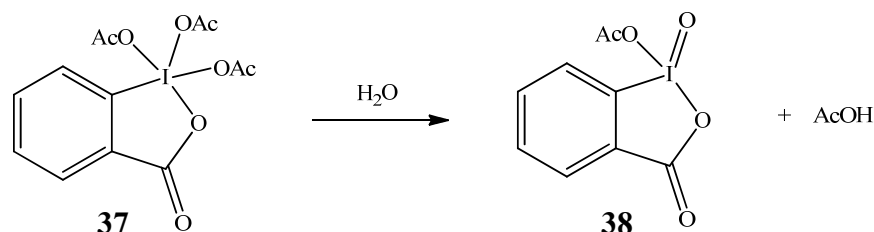


Esquema 4 - Mecanismo envolvido na oxidação de Swern.

C. Oxidação com reagentes de iodo hipervalente

A utilização do periodinano de Dess-Martin (DMP, **37**), apresenta algumas vantagens, relativamente aos métodos descritos anteriormente. O facto de a reacção poder ocorrer ao ar e à temperatura ambiente aliados à diminuição no tempo de reacção tornam o método vantajoso, para a formação de aldeídos ou cetonas a partir de alcoóis primários ou secundários, respectivamente. Embora inicialmente esta reacção começasse por ser efectuada em solventes orgânicos anidros verificou-se que a existência de água no meio elevava a eficiência destas reacções de oxidação. Isto porque a reacção do DMP com água leva à formação do iodinano **38** (Esquema 5), que é um oxidante muito mais eficaz e rápido do que o seu precursor. Assim

as condições experimentais mais comuns nas oxidações com DMP envolvem a utilização de solventes como o diclorometano e a adição de uma quantidade controlada de água (garantindo a formação *in situ* de 38) à temperatura ambiente. É ainda adicionada uma base (como a piridina ou bicarbonato de sódio) garantindo a neutralização do ácido acético que é libertado na reacção de oxidação.^[38]



Esquema 5 - Esquem da reacção de formação do iodinano (38).

D. Oxidação com ruténio

A utilização de reagentes de ruténio é um método útil na reacção de oxidação de compostos orgânicos. Devido às elevadas propriedades oxidantes, este tipo de reagentes são muitas vezes utilizados em síntese orgânica para a transformação de éteres em ésteres, para a oxidação de grupos ligados a anéis aromáticos, a ácidos carboxílicos e para a introdução de átomos de oxigénio em hidrocarbonetos saturados. É também possível oxidar alcoóis a aldeídos ou cetonas através de alguns reagentes de ruténio como o perrutenato, RuO_4^- (7+) e o rutenato RuO_4^{2-} (6+). Em solução aquosa estes iões são muito instáveis resultando num equilíbrio de ruténio nos vários estados de oxidação. No entanto, o perrutenato torna-se solúvel em solventes orgânicos mediante a adição do contraíão tetra-*n*-propilamónio formando o perrutenato de tetrapropilamónio (TPAP, 39, Figura 12). O TPAP é utilizado em quantidade catalítica, num solvente orgânico como o diclorometano, na presença de um oxidante secundário, 4-metilmorfolina-*N*-óxido (NMO, 40, Figura 12) que garante a regeneração do oxidante. Este é considerado um método de rotina para a oxidação de alcoóis a aldeídos ou cetonas.^[38]

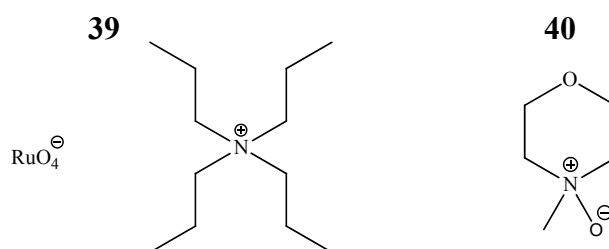


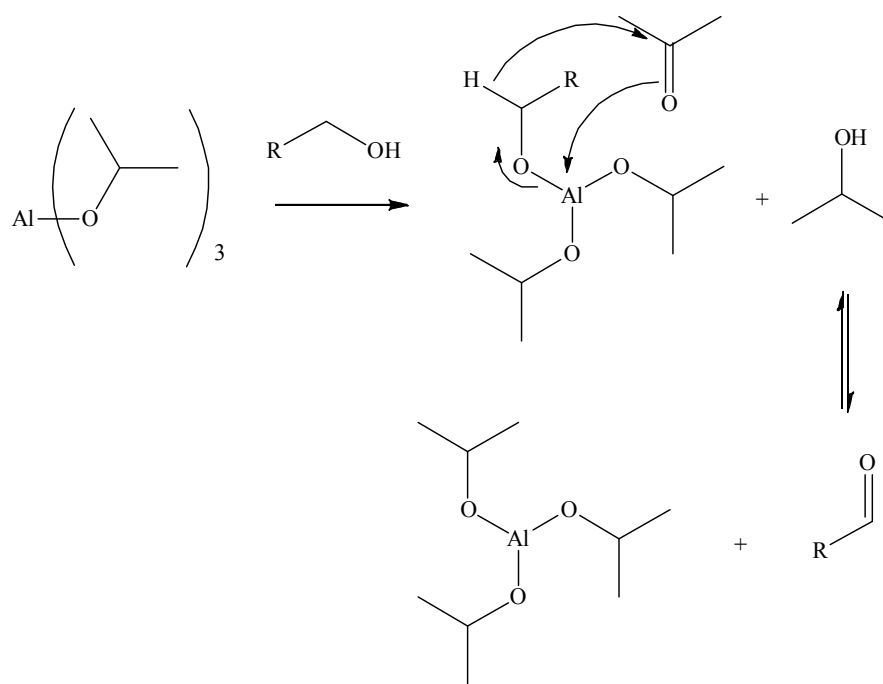
Figura 12 - Estrutura do TPAP (39) e do NMO (40).

E. Oxidação mediada pelo 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil

A utilização do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO, **41**) como reagente de oxidação é particularmente importante na oxidação selectiva de alcoóis primários a aldeídos na presença de alcoóis secundários. As condições experimentais mais utilizadas neste tipo de oxidações, são conhecidas como o protocolo de Anelli e envolvem a utilização de um sistema bifásico (água-diclorometano) na presença de cerca de 1mol% de TEMPO, 0.1 eq. de KBr e um excesso do oxidante secundário NaOCl, a 0°C. Segundo este procedimento a subsequente oxidação do aldeído a ácido carboxílico é muito lenta. No entanto ocorre a formação de HOCl durante a reacção, um oxidante secundário que pode reagir com olefinas presentes levando à formação de cloro-hidratos. Este tipo de reacção indesejada pode ser evitada com a utilização de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, segundo o protocolo de Piancatelli e Margarita.^[38]

F. Oxidação por transferência de hidreto a partir de alcóxidos metálicos

Os alcóxidos de alumínio são os alcóxidos metálicos mais comuns para a oxidação de alcoóis. A reacção de oxidação envolve a adição de acetona de modo a deslocar o equilíbrio no sentido dos produtos (Esquema 6). O método, designado oxidação de Oppenauer, é extremamente bem sucedido na oxidação de esteróides, no entanto quando aplicado a outro tipo de compostos orgânicos, a formação de aldeídos ou de cetonas é limitada, devido à ocorrência de reacções secundárias induzidas pelo carácter básico do alcóxido.^[38]

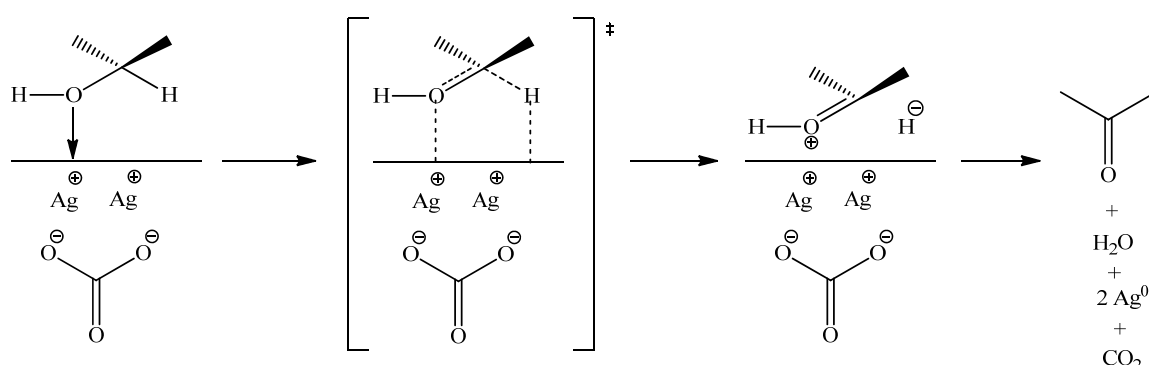


Esquema 6 - Mecanismo da reacção de oxidação de Oppenauer.

G. Oxidação com reagente de *Fétizon*

O reagente carbonato de prata em celite (reagente de *Fétizon*) é obtido a partir de uma solução aquosa de nitrato de prata e carbonato de sódio na presença de celite, e é facilmente filtrado e lavado. O reagente de *Fétizon* possui elevada selectividade na oxidação de alcoóis, em condições suaves; no entanto o elevado preço faz com que a sua utilização seja diminuta.

O mecanismo da reacção consiste inicialmente na adsorção do álcool à superfície do suporte. A oxidação prossegue com a formação de um estado de transição onde o átomo de oxigénio do álcool e o hidrogénio α complexam com os dois catiões de prata. A libertação dá origem ao aldeído pretendido (Esquema 7).^[38]



Esquema 7 - Mecanismo da reacção de oxidação com o reagente de *Fétizon*.

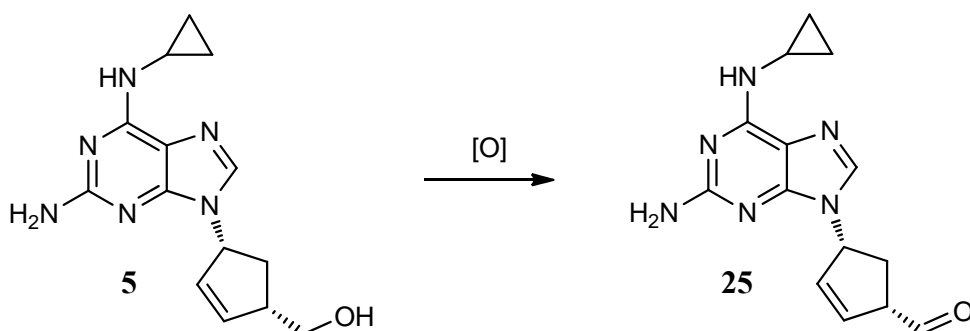
H. Oxidação com dióxido de manganês

A reacção de oxidação com dióxido de manganês (MnO_2 , **42**) é selectiva para alcoóis alílicos e benzílicos, à temperatura ambiente. O carácter π facilita a interacção do reagente com o álcool. Para além de sistemas insaturados, a existência de anéis ciclopropano ou de heteroátomos no álcool resultam numa maior eficácia deste tipo de reacções. O poder da oxidação depende da reactividade da espécie de MnO_2 , ou seja, da preparação do reagente activo. O mais comum é a utilização do reagente sob a forma de sólido em suspensão, apesar de se notar uma perda na sua eficiência.^[38]

1.6 - Objectivos

Um dos metabolitos maioritários do abacavir é o 1``-carboxilato (**23**), proveniente de uma oxidação *in vivo*. Sabe-se que a síntese de ácidos carboxílicos a partir de reacções de oxidação passa pela formação de um intermediário na forma de aldeído. Embora as tentativas anteriores para a preparação deste metabolito aldeídico do abacavir nunca tivessem sido bem sucedidas, alegadamente devido à sua instabilidade, ^[27] um dos objectivos deste trabalho consistiu na preparação deste metabolito para que posteriormente se pudesse investigar a sua participação na formação de aductos covalentes com bionucleófilos.

Uma via simples para a obtenção deste metabolito envolveria a oxidação do abacavir (**5**) ao aldeído **25**, (Esquema 8). Assim, e dado que não foi possível ter acesso a quantidade substancial de abacavir puro, por via comercial, a estratégia inicial traçada passou pela extracção do abacavir do comprimido *Ziagen*® (secção 2.1). Posteriormente testou-se a utilização de diversos oxidantes, em diferentes condições experimentais na expectativa de otimizar a oxidação selectiva do álcool primário a aldeído (secção 2.2).



Esquema 8 - Reacção de oxidação do álcool primário do abacavir para a formação do aldeído.

A formação do metabolito intermediário aldeídico e a susceptibilidade para a reacção com nucleófilos, poderá explicar a toxicidade associada ao abacavir. Tal como acontece com outros xenobióticos a possibilidade de formação de aductos covalentes entre intermediários aldeídicos e as proteínas poderá estar na génese destes eventos tóxicos. Assim, a preparação e caracterização estrutural de padrões sintéticos de aductos permitirá a biomonitorização destes possíveis biomarcadores de toxicidade, possibilitando um conhecimento mais profundo do processo de metabolização e toxicidade conduzindo eventualmente à minimização dos efeitos adversos associados ao fármaco.

Assim, o principal objectivo deste trabalho passou pela preparação de padrões de aductos formados por reacção do(s) aldeído(s) derivado(s) do abacavir e vários bionucleófilos. Para tal, efectuaram-se vários ensaios em que se promoveu a reacção do(s) aldeído(s) do

abacavir com aminoácidos, péptidos, proteínas e com a 2'-desoxiguanosina. Os aminoácidos utilizados nos ensaios foram: a lisina, a fmoc-lisina, o hidrocloreto de valinato de etilo e a *N*-acetil-cisteína. A glutathione foi o péptido utilizado e as proteínas do sangue HSA e Hb foram as proteínas utilizadas nas reacções de incubação com o metabolito electrófilo do abacavir. Estes ensaios foram realizados tanto a partir do(s) aldeído(s) isolado(s) como de misturas reaccionais provenientes da oxidação de Swern. Testaram-se ainda outros métodos (não biomiméticos) para a preparação dos padrões pretendidos (secção **2.4.6**).

Capítulo 2 - Discussão de Resultados

2.1 - Extração e caracterização do composto activo do Ziagen®

Cada comprimido Ziagen é composto por 300 mg de abacavir sob a forma de sulfato e pelos ingredientes inactivos: dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, celulose, e amido glicolato de sódio. Os comprimidos estão envolvidos por uma camada de hidroxipropilmetilcelulose, polisorbato 80, óxido de ferro amarelo sintético, dióxido de titânio e triacetina. Para extrair o composto activo, o comprimido foi pulverizado, dispersado em água e filtrado. A solução aquosa obtida foi extraída com diclorometano, de modo a separar os compostos apolares. Com o aumento do pH neutralizou-se o abacavir que se encontrava na forma protonada (solução original a pH 5). Verificou-se que bastava aumentar o pH até 8 para se obter, um rendimento quantitativo por extração com diclorometano.

Através da análise do espectro de ^1H -RMN do produto obtido após extração e comparando com o espectro do abacavir referência (obtido a partir de uma amostra padrão), confirmou-se a pureza do abacavir extraído e constatou-se que apresentavam os mesmos desvios químicos (Figura 13).

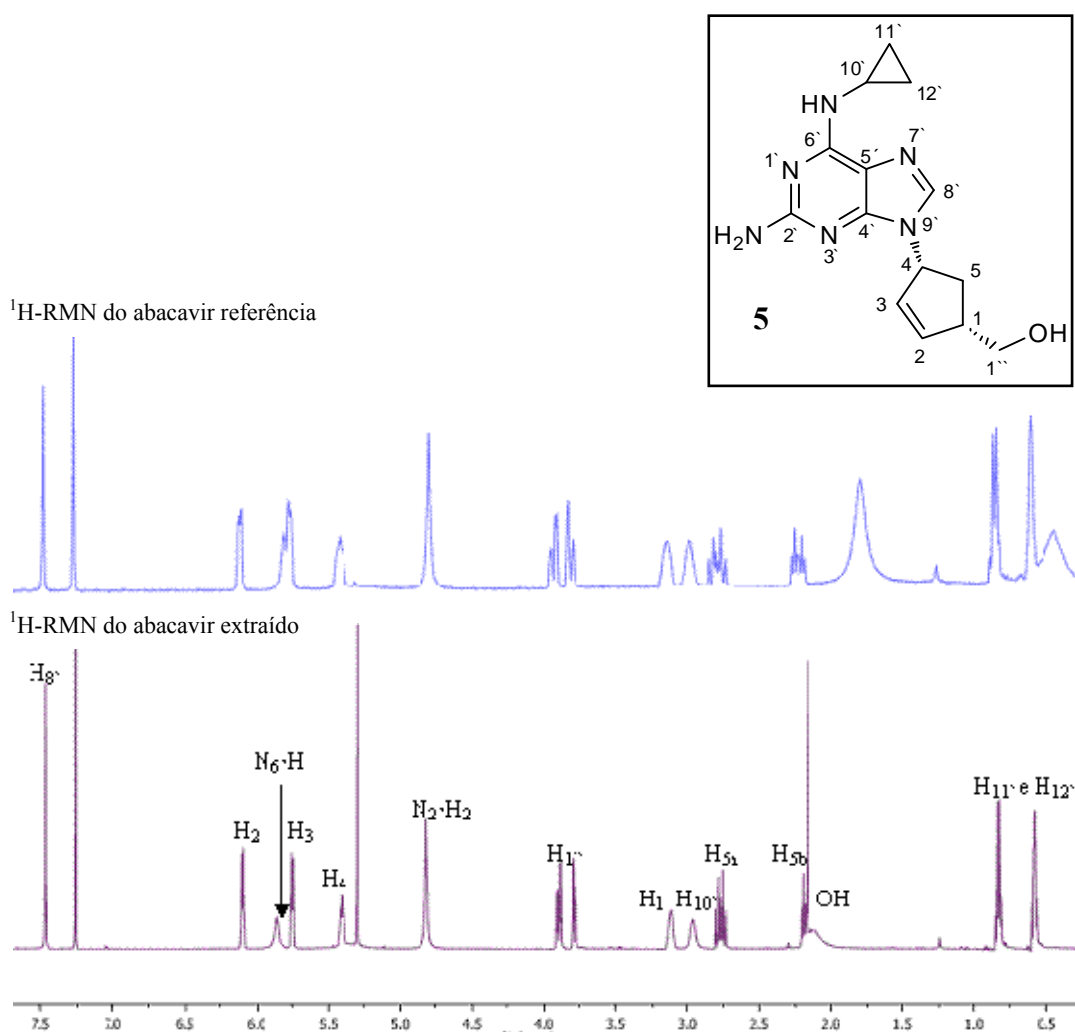


Figura 13 - Comparação entre os espectros de ^1H -RMN (CDCl_3) do abacavir extraído e do abacavir referência.

Apesar de os dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do abacavir estarem descritos na literatura, ^{[39], [40]} não foi até à data feita a atribuição total dos sinais à estrutura da molécula. Pelo que se decidiu apresentar a sua caracterização total para clarificar e para evidenciar as semelhanças relativamente aos espectros de RMN obtidos para os derivados do abacavir, preparados ao longo deste trabalho.

A atribuição dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (apresentadas na Tabela 2, pág. 40) foi efectuada com base na análise dos resultados obtidos nas experiências de DEPT e bidimensionais HMBC (Figura 14), HSQC e COSY:

- Os dois multipletos entre 0,57 ppm e 0,60 ppm e entre 0,81 ppm e 0,85 ppm, que apresentam correlação no espectro de HSQC com os carbonos secundários a 7,5 ppm, foram atribuídos aos quatro protões do anel de ciclopropilo ($\text{H}_{11'}$ e $\text{H}_{12'}$). Estes protões apresentam ainda correlação no espectro de COSY com o singuleto largo a 2,96 ppm, correspondente ao protão na posição 10' do anel de ciclopropilo. O protão $\text{H}_{10'}$ apresenta correlação com o carbono terciário a 23,8 ppm ($\text{C}_{10'}$), no espectro de HSQC.

- Os dois multipletos entre 2,16 ppm e 2,21 ppm e entre 2,74 ppm e 2,81 ppm, que apresentam correlação no espectro de HSQC com o carbono secundário a 32,4 ppm (C_5), foram atribuídos aos dois protões na posição 5 do ciclopenteno, uma vez que apresentam correlação no espectro de COSY com os multipletos entre 3,10 ppm e 3,13 ppm e entre 5,39 ppm e 5,43 ppm, correspondentes aos protões ligados aos carbonos terciários nas posições 1 e 4, respectivamente. No espectro de HMBC estes protões apresentam correlação a 3 ligações com os carbonos $\text{C}_{1'}$ (65,4 ppm), C_2 (138,3 ppm) e C_3 (130,7 ppm) (Figura 14).

- Os dois duplos dupletos a 3,79 ppm e a 3,90 ppm foram atribuídos aos dois protões geminais na posição adjacente ao grupo OH ($\text{H}_{1'}$) uma vez que apresentam correlação no espectro de HSQC com o carbono primário a 65,4 ppm, cujo desvio é compatível com um carbono primário ligado a um oxigénio. Estes protões apresentam uma constante de acoplamento geminal de 10,8 Hz e constantes de acoplamento vicinais de 3,8 Hz ($\text{H}_{1'a}$) e 2,9 Hz ($\text{H}_{1'b}$). Esta correlação com os protões da posição 1 do anel de ciclopenteno é comprovada no espectro de COSY. No espectro de HMBC são ainda observadas as correlações a três ligações com os carbonos C_5 (32,4 ppm) e C_2 (138,3 ppm) (Figura 14).

- Os protões correspondentes à ligação dupla do ciclopenteno, foram atribuídos aos dois multipletos entre 5,74 ppm e 5,76 ppm (H_3) e entre 6,09 ppm e 6,11 ppm (H_2) por apresentarem no espectro de HSQC correlação com os sinais a 130,7 e 138,2 ppm, respectivamente, que são valores de desvio químico compatíveis com a existência de dois protões olefinicos. O multipletos entre 6,09 ppm e 6,11 ppm foi atribuído à posição 2 da ligação dupla, por apresentar correlação a 3 ligações no espectro de HMBC com o carbono

C₁'' (65,4 ppm). O próton correspondente à posição 3 da ligação dupla apresenta correlação no espectro de COSY com os prótons H₄ e H₂.

- O singuleto a 7,46 ppm foi atribuído ao próton na posição 8' da purina, por apresentar correlação a 3 ligações com os carbonos quaternários a 115,8 ppm (C₅') e a 150,2 (C₄'). A atribuição destes carbonos quaternários foi feita sabendo-se que o carbono na posição 4', entre dois átomos de azoto, se apresenta mais desblindado, portanto a campo mais baixo que C₅'.

- No espectro de ¹³C-RMN, o sinal a 156,6 ppm e o sinal a 159,4 ppm correspondem aos carbonos quaternários nas posições 2' e 6' da purina, que por não existirem quaisquer correlações no espectro de HMBC com estes sinais não foi possível fazer a atribuição.

- O singuleto a 4,82 ppm que integra para dois prótons e o singuleto a 5,85 ppm, que integra para um próton, correspondem aos prótons lábeis das amins primária (N₂H₂) e secundária (N₆H), respectivamente.

O espectro de massa, obtido por *electrospray* (ESI), apresentou a m/z 287, o pico correspondente à molécula protonada de abacavir. No espectro de IV observou-se a existência de uma banda a 3324 cm⁻¹ concordante com a frequência de vibração da ligação O-H do grupo hidroxilo.

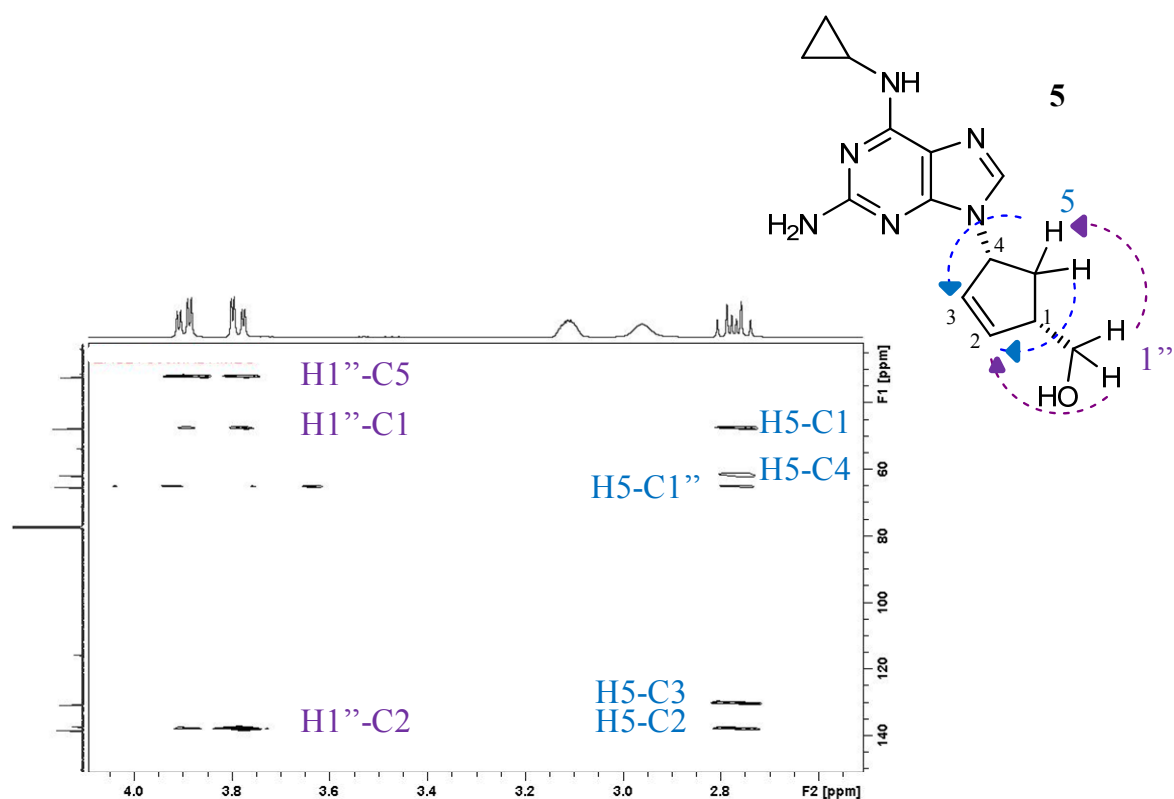


Figura 14 - Ampliação do espectro de HMBC do abacavir extraído, destacando-se as correlações a três ligações (H-C) dos sinais atribuídos aos prótons nas posições 1'' (a roxo) e 5 do anel de ciclopenteno (a azul).

2.2 - Reacções de oxidação do abacavir para a formação dos metabolitos aldeídicos

2.2.1 - Reacção de oxidação com o clorocromato de piridínio e clorocromato de piridínio em suporte polimérico

Num dos primeiros ensaios de oxidação do abacavir testou-se a utilização do reagente de crómio, o clorocromato de piridínio (PCC, **30**), para a oxidação do abacavir ao aldeído correspondente. À partida, este seria um bom método para oxidação do álcool primário, com condições experimentais simples. A maior dificuldade neste método deve-se à formação de um resíduo viscoso contendo os sais de crómio reduzido. De modo a combater este problema e a facilitar o tratamento da mistura reaccional final, adicionou-se sílica ou alumina que funcionaram como adsorventes deste resíduo. Num primeiro ensaio (descrito em **3.3.2.1**, método geral I, ensaio 1), efectuado na presença de sílica utilizaram-se 1,1 eq. do oxidante e verificou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] que após 4,5 horas ainda havia material de partida. Então adicionou-se mais 1,1 eq. de PCC, verificando-se o aparecimento de um composto com R_f superior ao do abacavir (comportamento esperado, à partida para um derivado aldeídico). Num outro ensaio (descrito em **3.3.2.1**, método geral I, ensaio 2), na presença de alumina e de 2,0 eq. de PCC, verificou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] o consumo total do material de partida, após 24 horas de reacção. Após extracção e filtração das misturas nos dois ensaios realizados, as misturas brutas foram analisadas por ^1H -RMN. No entanto foram observados apenas alguns sinais a campo alto, não havendo assim indicação da formação de qualquer derivado do abacavir. Uma explicação para estes resultados poderia ser o facto de os compostos formados terem também ficado adsorvidos na sílica ou na alumina.

Assim, efectuaram-se dois ensaios na ausência destes adsorventes, com tempos de reacção diferentes. Num primeiro ensaio (descrito em **3.3.2.1**, método geral I, ensaio 3) a reacção foi iniciada com 2,0 eq. de PCC e passados 30 minutos do início da reacção observou-se, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] que apesar de ainda haver abacavir por reagir, havia já a formação de dois produtos, ambos com R_f superior ao abacavir. Foram adicionados mais 0,5 eq. de PCC e após 2,5 horas de reacção observou-se, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] que as intensidades das manchas correspondentes aos produtos formados haviam diminuído, comparativamente ao cromatograma inicial. Assim no segundo ensaio (descrito em **3.3.2.1**, método geral I, ensaio 4) utilizaram-se apenas 2,0 eq. de PCC e a reacção foi parada após 45 minutos de reacção. No entanto, os resultados obtidos nestes dois

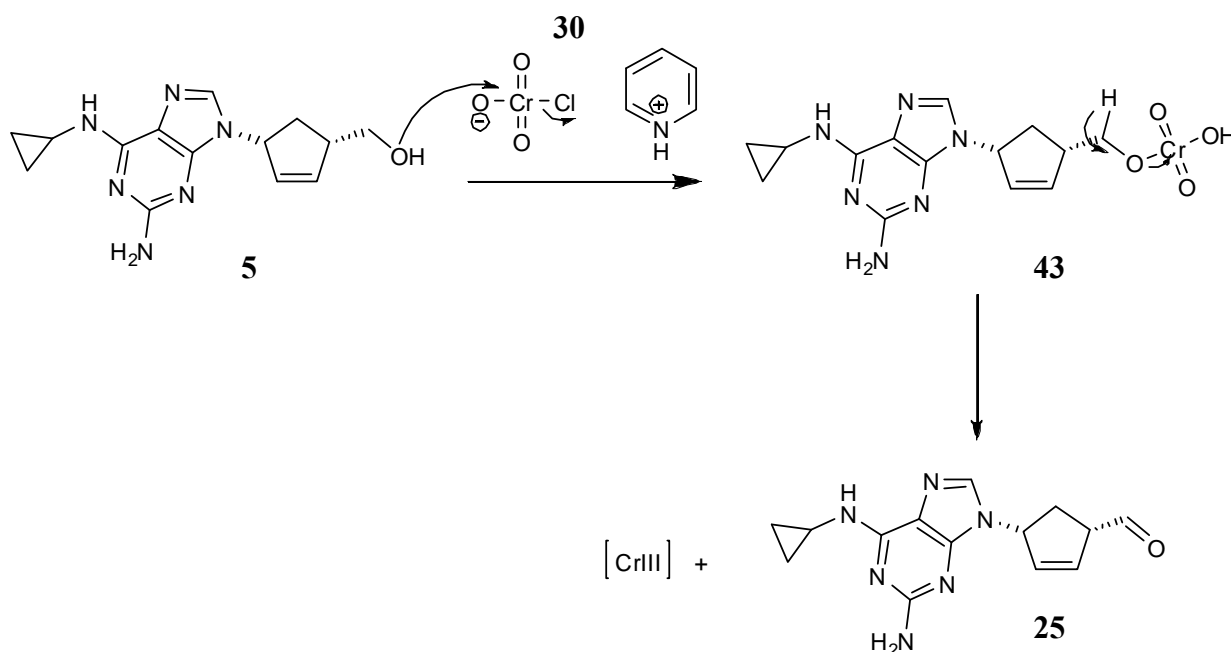
ensaios foram muito semelhantes: quer a análise por ^1H -RMN dos produtos isolados no primeiro ensaio, por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica], quer a análise da mistura reaccional no segundo ensaio, não mostraram evidência da formação de qualquer derivado aldeídico.

Outro modo de ultrapassar a dificuldade no tratamento final de reacções com reagentes de crómio é a utilização do PCC em suporte polimérico (PVPCC). Os reagentes em suporte polimérico apresentam a vantagem de serem insolúveis no meio reaccional e consequentemente, facilitarem a separação do produto. ^[41] No entanto, a utilização deste tipo de reagentes requer condições reaccionais menos suaves, que envolvem a utilização de hidrocarbonetos apolares como solventes, com um excesso de PVPCC e o aumento da temperatura de reacção. ^[42]

Num primeiro ensaio (descrito em **3.3.2.1**, método geral II, ensaio 1) utilizaram-se as condições experimentais utilizadas para a reacção com o PCC (em diclorometano e com 1,1 eq. do reagente PVPCC) com refluxo. Após um dia de reacção, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] não se observou a formação de qualquer produto de reacção. Este resultado era de certa forma esperado uma vez que o solvente utilizado não é o mais adequado para este tipo de reagente dada a necessidade, em geral, de elevadas temperaturas de reacção. ^[42] Assim, num ensaio posterior (descrito em **3.3.2.1**, método geral II, ensaio 2) decidiu-se utilizar o *p*-xileno como solvente e um excesso de PVPCC, como descrito por Bergbreiter e colaboradores. ^[43] A reacção foi controlada por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] durante 5 dias, tendo-se adicionado um total de 6.0 eq. de PVPCC. Embora o espectro de ^1H -RMN da mistura bruta obtida no final da reacção tenha revelado a existência de um protão com $\delta=9,98$ ppm, compatível com um protão de aldeído, observou-se a existência de outros sinais não compatíveis com a estrutura do composto pretendido. Face a este resultado repetiram-se as condições experimentais com a excepção do número de equivalentes de PVPCC, adicionando-se apenas 4,0 eq. (descrito em **3.3.2.1**, método geral II, ensaio 3) de modo a precaver a formação de produtos secundário. A análise por ^1H -RMN da mistura bruta revelou semelhanças com o espectro obtido no ensaio anterior. No entanto, após purificação da mistura reaccional por HPLC semi-preparativo, a análise por ^1H -RMN do produto maioritário isolado, não revelou a existência de sinais compatíveis com o composto esperado.

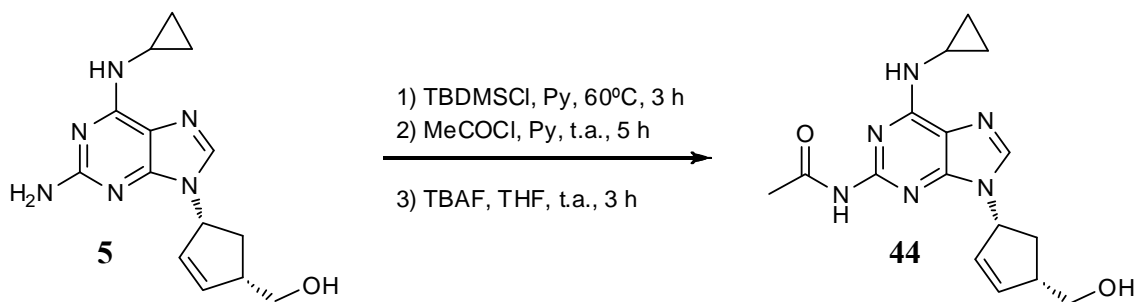
À partida o método de oxidação com estes reagentes de crómio seria um bom método para a oxidação do álcool primário do abacavir, no entanto, nitidamente nos ensaios efectuados houve a ocorrência de uma série de reacções laterais. Normalmente os alcenos não interferem na oxidação de alcoóis, com o PCC, pelo que a existência da ligação dupla no abacavir não deverá estar envolvida em reacções secundárias com o PCC. No entanto, por um lado o

abacavir possui uma amina primária na posição 2' da unidade de purina que poderá promover algumas reacções secundárias, uma vez formado o aldeído, reagindo intra ou intermolecularmente com este grupo amina levando à formação de uma imina. Por outro lado, o mecanismo proposto (Esquema 9) para a reacção de um álcool com o PCC passa por um intermediário na forma de éster de cromato (**43**), que poderá suscitar a formação de produtos secundários através de reacções inter ou intramoleculares com outros grupos funcionais nucleófilos da molécula. [38]



Esquema 9 - Mecanismo esperado para a oxidação do abacavir com o PCC (30).

Assim, resolveu-se proteger o grupo amina do abacavir de forma a evitar estas possíveis reacções secundárias. A preparação do *N*-acetil-abacavir (**44**) envolveu três passos reaccionais: protecção do álcool primário com cloreto de *tert*-butil-dimetilsilano (TBDMSCl), seguida pela acetilação da amina primária com cloreto de acetilo e por fim a desprotecção do álcool com solução de fluoreto de terta-*n*-butil-amónio (TBAF) em THF (Esquema 10). O composto pretendido foi obtido com um rendimento de 48% e a sua formação foi comprovada por RMN. No espectro de ¹H-RMN, observou-se a existência de um singuleto a 2,55 ppm, que integra para 3 protões, e de um singuleto a 5,99 ppm, que integra para 1 protão, correspondentes respectivamente ao grupo metilo e ao protão lábil da amida. A evidência da existência deste grupo é ainda comprovada no espectro de ¹³C-RMN pela existência do sinal a 172,6 ppm correspondente ao carbono de um grupo carbonilo. Os restantes sinais são concordantes com aqueles atribuídos à estrutura do abacavir.



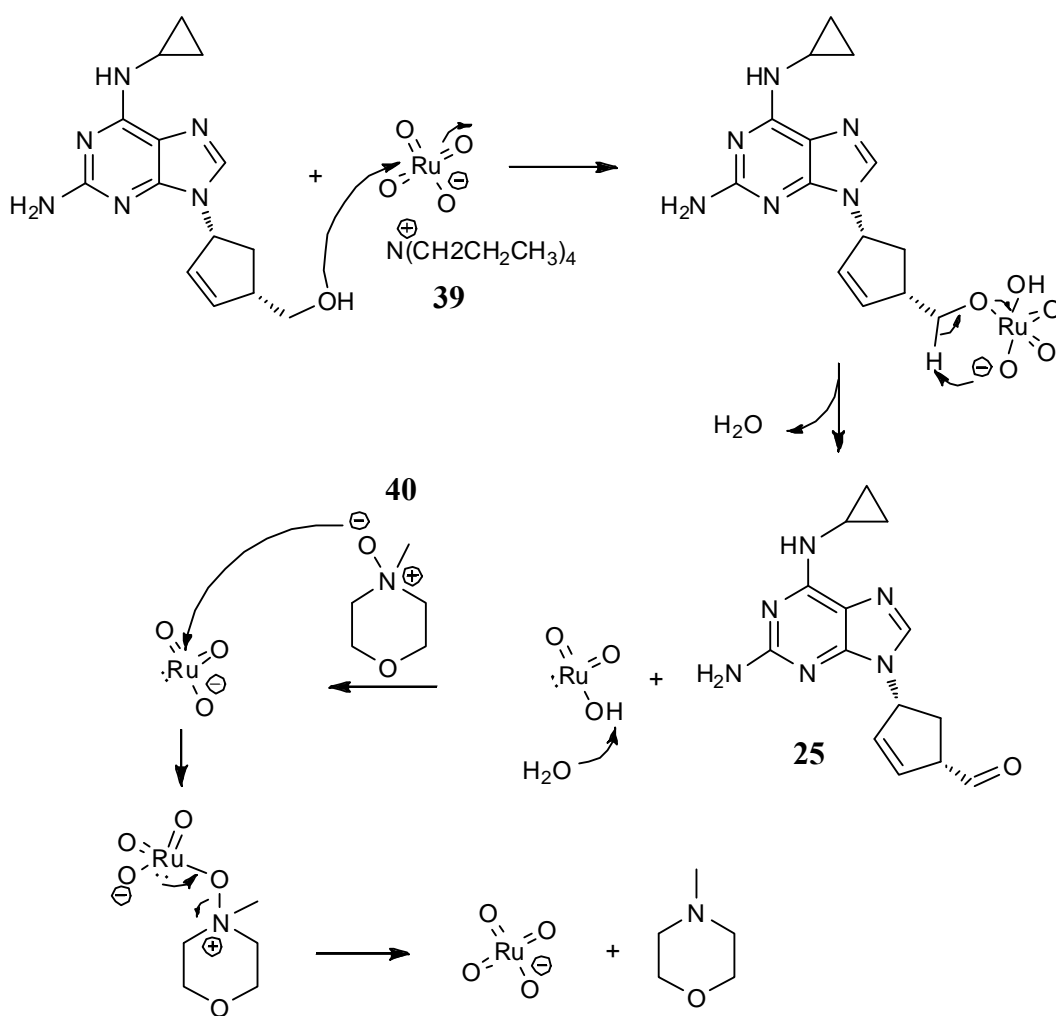
Esquema 10 - Esquema reaccional para a preparação do *N*-acetil-abacavir (44).

Procedeu-se à oxidação, com o PCC, tendo como material de partida o *N*-acetil-abacavir (44). Neste ensaio (descrito em 3.3.3.1, método I) usaram-se inicialmente as condições utilizadas na oxidação do abacavir com PCC: diclorometano como solvente e um excesso de PCC (2,0 eq.). Após 1,5 horas do início da reacção adicionou-se mais 1,0 eq. de PCC e após a noite verificou-se, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica], o consumo total do material de partida com formação de diversos produtos de reacção. Isolaram-se os dois produtos maioritários, por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica]; no entanto, os espectros de ^1H -RMN destes compostos eram muito complexos não possibilitando a identificação dos produtos formados. Realizou-se ainda outro ensaio com 2,0 eq de PCC (descrito em 3.3.3.1, método II), que apresentou, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] resultados semelhantes aos obtidos no ensaio anterior. Dado que nos ensaios efectuados com estes reagentes de crómio não se obteve os produtos desejados, decidiu-se não se dispender mais tempo para perceber a razão deste insucesso optando-se por explorar outros métodos de oxidação de alcoóis primários.

2.2.2 - Reacção com o perrutenato de tetrapropilamónio

Realizaram-se dois ensaios de oxidação do abacavir catalisada pelo Perrutenato de tetrapropilamónio (TPAP, 39, 0,05 eq.), Esquema 11 na presença do oxidante secundário 4-metilmorfolina-*N*-óxido (NMO, 40, 1,5 eq.), sobre peneiros moleculares. Num primeiro ensaio (descrito em 3.3.2.3, método geral, ensaio 1), utilizou-se diclorometano seco como solvente, resultando na formação de dois produtos que por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] apresentavam um R_f superior ao do abacavir. No entanto, após purificação por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica], os espectros de ^1H -RMN não revelaram a presença do protão com desvio químico característico de aldeídos.

Embora o diclorometano seja o solvente mais frequentemente utilizado neste tipo de oxidação, muitas vezes é necessário usar outros solventes como o acetonitrilo, que complexa com o ruténio evitando a inactivação do metal por união com outros ligandos. ^[38] Assim, efectuou-se um segundo ensaio (descrito em 3.3.2.3, método geral, ensaio 2), mantendo-se as restantes condições experimentais, utilizando como solvente o acetonitrilo. No entanto os resultados obtidos neste ensaio foram em tudo semelhantes aos obtidos no ensaio com diclorometano.



Esquema 11 - Mecanismo esperado para a oxidação do abcavir com o TPAP, com regeneração do oxidante.

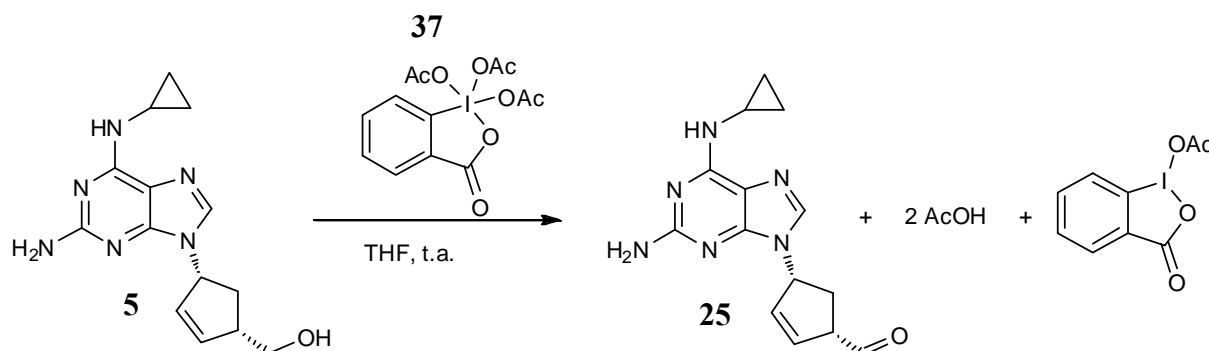
Normalmente utilizam-se 0,05 eq. de TPAP, mas com esta quantidade catalítica é apenas possível fazer um número limitado de ciclos catalíticos, uma vez que à medida que a reacção decorre parte do TPAP vai ficando inactivado. Assim, em alguns ensaios é necessário aumentar o número de eq. de catalisador ou mesmo utilizar quantidades estequiométricas. ^[38]

Como nos ensaios anteriores se verificou por c.c.f. que a formação dos produtos ocorria em pequena escala, num terceiro ensaio utilizaram-se 0,08 eq. de TPAP (descrito em 3.3.2.3, método geral, ensaio 3). Por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] observou-se a formação dos dois produtos identificados nos ensaios anteriores. Através de pulverização com DNP confirmou-se a presença de um grupo carbonilo no produto de R_f inferior; no entanto após purificação, não se observou por ^1H -RMN a existência de um sinal com desvio químico compatível com a presença de um próton aldeídico na molécula.

Muitos são os grupos funcionais que não interferem na oxidação de alcoóis com o TPAP; no entanto as amins secundárias podem levar à formação de iminas.^[44] O insucesso desta reacção pode assim estar relacionado com a possibilidade de reacções secundárias do abacavir com o TPAP ou na oxidação a ácido como já foi referido por outros autores.^[45]

2.2.3 - Reacção com periodinano de Dess-Martin

Os ensaios realizados com o periodinano de Dess-Martin (**37**, DMP) foram efectuados segundo os procedimentos usuais, à temperatura ambiente e em THF.^[38] Nesta reacção não houve necessidade de cuidados com a utilização de solvente seco, uma vez que, como já foi referido, a presença de água na mistura reaccional aumenta a eficiência e a velocidade da reacção. Dado que a reacção de oxidação pelo DMP leva à formação de ácido acético, há necessidade de utilizar uma base para o neutralizar (Esquema 12). Num dos ensaios (descrito em 3.3.2.4, método geral, ensaio 1), utilizou-se a piridina como base e no outro ensaio utilizou-se hidrogenocarbonato de sódio (descrito em 3.3.2.4, método geral, ensaio 2). No entanto, os resultados obtidos em ambos ensaios foram em tudo semelhantes. A análise das misturas reaccionais, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,05)] seguida por pulverização com DNP, não evidenciou a existência de compostos carbonílicos na mistura.



Esquema 12 - Esquema reaccional para a reacção a oxidação do abacavir com DMP, segundo o procedimento usual.

2.2.4 - Reacção com dióxido de manganês (IV)

Embora o dióxido de manganês (MnO_2 , **42**) seja usualmente utilizado na oxidação de alcoóis alílicos, benzílicos ou ligados a anéis de ciclopropeno ^[38] resolveu-se testar este reagente na oxidação do abacavir por existir a possibilidade de isomerização da dupla ligação em algum intermediário da reacção.

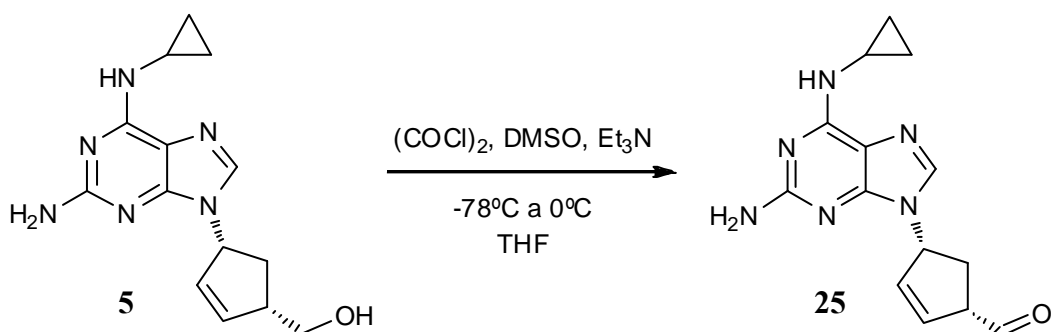
Neste método de oxidação do álcool com o MnO_2 utilizou-se um excesso do oxidante (20,0 eq.) e diclorometano seco como solvente. A reacção foi controlada por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1)] e ao fim de 4 horas de reacção, verificou-se a formação de um produto, cuja coloração após pulverização com DNP revelou possuir um grupo carbonilo. Na expectativa de ocorrer o consumo total do material de partida controlou-se a reacção durante 4 dias. Não se verificando o esperado, filtrou-se a mistura reaccional e analisou-se a mistura bruta por HPLC analítico. Observou-se apenas um pico maioritário correspondente ao material de partida.

Embora neste tipo de reacções de oxidação, o procedimento geral envolva a utilização de solventes apolares como o pentano, o *n*-hexano ou o ciclohexano, de modo a evitar a competição com o álcool na adsorção às partículas de MnO_2 , são muitos os autores que usam o diclorometano para obtenção de aldeídos ou cetonas, uma vez que oferece um bom ponto de equilíbrio entre a polaridade e o poder de solubilização. ^[38] Portanto o insucesso na aplicação deste método de oxidação poderá estar relacionado com outro factor que não o solvente utilizado, nomeadamente pelo facto de não se tratar de um álcool alílico.

2.2.5 - Reacção de Swern

A oxidação de Swern, é dos métodos de oxidação por activação da molécula de dimetilsulfóxido (DMSO), o mais amplamente utilizado para a conversão de alcoóis a aldeídos.

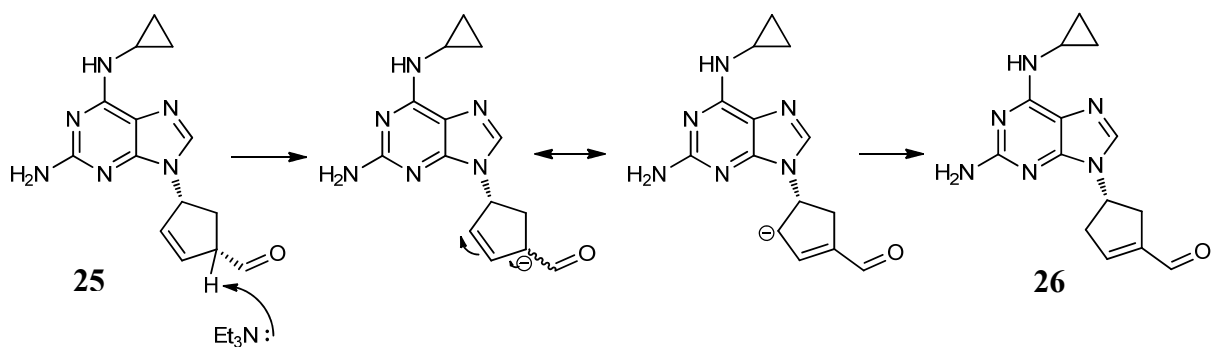
Na reacção de oxidação do abacavir através do método de Swern reproduziram-se inicialmente as condições experimentais descritas por Trost e Thaisrivongs ^[46] (Esquema 13). O passo inicial desta reacção, que consiste na formação da espécie activada, foi promovido fazendo-se reagir o DMSO (2,6 eq.) com cloreto de oxalilo ($(\text{COCl})_2$, 1,3 eq) em THF e a -78°C . A esta mistura adicionou-se o abacavir mantendo-se a temperatura. Após 1 hora de reacção, a adição de trietilamina e o aumento da temperatura para 0°C conduz à formação do aldeído (Esquema 13).



Esquema 13 - Esquema reaccional para a preparação do aldeído 25 por oxidação de Swern.

Neste ensaio (Tabela 1, ensaio 1) embora se tenha verificado (por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica]) que não houve consumo total do material de partida, observou-se a formação de uma mancha com R_f superior ao do abacavir que, por pulverização com DNP, confirmou tratar-se de um composto carbonílico. Após extracção com solução aquosa, a fase orgânica foi seca e destilada a pressão reduzida obtendo-se um resíduo que foi analisado por ^1H -RMN. Esta análise preliminar permitiu concluir que houve formação de um aldeído: para além da identificação dos sinais correspondentes ao abacavir que não foi consumido, foi possível identificar os sinais correspondentes ao aldeído inclusive um sinal com desvio químico de 9,8 ppm compatível com o protão de um aldeído. De facto quando se isolou a mistura reaccional por c.c.f.p. foi possível isolar o (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (aldeído conjugado, **26**, Esquema 14) com um rendimento de 18%.

A isomerização da ligação dupla nas condições da oxidação de Swern, usando como base a trietilamina foi já observada com outros substractos.^[38] Esta isomerização ocorre devido à possibilidade de formação de um enolato alílico, que reverte para o aldeído α,β -insaturado, muito mais estável termodinamicamente (Esquema 14). A obtenção deste isómero foi muito importante para a continuação do trabalho, na medida em que o trabalho de Walsh *et al*^[27], tal como já foi discutido anteriormente (secção 1.3.1), prevê a possibilidade deste isómero também se formar *in vivo*.



Esquema 14 – Mecanismo proposto para a formação do aldeído α,β -insaturado 26.

Esta isomerização poderá ser evitada utilizando uma amina mais impedida estereoquímicamente. Assim, num segundo ensaio onde se utilizaram 4,0 eq. de DMSO, e 2,0 eq. de $(\text{COCl})_2$, utilizou-se como base a *N,N*-di-isopropiletilamina. Nestas condições, foi possível isolar por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] o aldeído (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (aldeído não conjugado, **25b**, Esquema 14) com um rendimento de 7%. Curiosamente, num outro ensaio com a diminuição do número de equivalentes de DMSO (2,6 eq.) e de $(\text{COCl})_2$ (1,3 eq.) utilizando-se a mesma base, observou-se por ^1H -RMN que o produto obtido apresentava a ligação dupla conjugada com o grupo carbonilo, correspondendo ao produto **26**, (Tabela 1, ensaio 8 vs 9).

Embora sem sucesso, efectuaram-se outros ensaios em que se modificaram as condições experimentais com o objectivo de aumentar o rendimento de formação destes aldeídos. O solvente utilizado, a temperatura à qual é promovida a reacção com a base e o tratamento da mistura no fim da reacção são os factores mais determinantes nesta reacção de oxidação, pelo que foram estes os parâmetros experimentais modificados. Nos ensaios realizados com um aumento do número de equivalente de DMSO e de $(\text{COCl})_2$, com a base trietilamina, em THF, verificou-se uma diminuição da eficiência da reacção (Tabela 1, ensaio 1 vs 4). Relativamente ao tratamento da mistura reaccional existem vários métodos descritos. Normalmente procede-se a um tratamento aquoso. No entanto, nestas condições poder-se-á formar o hidrato do aldeído pelo que muitas vezes se recorre ao chamado tratamento da mistura reaccional não aquoso. Assim em alguns ensaios o tratamento da mistura reaccional envolveu primeiro a adição de AcOEt e a mistura assim obtida foi posteriormente filtrada e o solvente destilado a pressão reduzida. Embora no ensaio em que foi utilizado um maior excesso de DMSO e de $(\text{COCl})_2$, os diferentes tratamentos da mistura reaccional não tenham influenciado o rendimento da reacção (Tabela 1, ensaio 3 vs 4), no ensaio em que se utilizou 2,6 eq. de DMSO e 1,3 eq. de $(\text{COCl})_2$, o tratamento não aquoso da mistura reaccional levou a uma diminuição drástica do rendimento (Tabela 1, ensaio 1 vs 2).

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos nos ensaios da oxidação do abacavir pelo método de Swern.

	Reagentes	Solvente	Tratamento da mistura reaccional	Tempo de reacção após adição de base (horas)	Temperatura após adição de base (°C)	Composto obtido e η (%)	
Ensaio	1 (COCl) ₂ (1,3 eq.) DMSO (2,6 eq.) Trietilamina (5,0 eq.)	THF	Aquoso	1,0	0	26	18
	2 (COCl) ₂ (1,3 eq.) DMSO (2,6 eq.) Trietilamina (5,2 eq.)		Não aquoso	1,0	0	26	<1
	3 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) Trietilamina (5,0 eq.)		Não aquoso	1,0	0	26	<3
	4 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) Trietilamina (5,2 eq.)		Aquoso	1,0	0	26	<3
	5 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) Trietilamina (5,0 eq.)	CH ₂ Cl ₂	Aquoso	5,0	T.a.	26	<1
	6 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) Trietilamina (5,0 eq.)		Aquoso	1,0	0	26	<1
	7 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) <i>N,N</i> -di-isopropiletilamina (5,0 eq.)		Aquoso	1,0	0		0
	8 (COCl) ₂ (2,0 eq.) DMSO (4,0 eq.) <i>N,N</i> -di-isopropiletilamina (5,0 eq.)	THF	Aquoso	1,0	0	25b	7
	9 (COCl) ₂ (1,3 eq.) DMSO (2,6 eq.) <i>N,N</i> -di-isopropiletilamina (5,2 eq.)		Aquoso	1,0	0	26	<8

O solvente mais utilizado na oxidação de Swern é o diclorometano, mas nos ensaios realizados com este solvente, verificou-se a diminuição do rendimento da reacção. Nestes ensaios, realizados em diclorometano seco, testou-se também o aumento da temperatura ou do tempo de reacção, após a adição da trietilamina (Tabela 1, ensaio 5 vs 6). No entanto estas alterações conduziram a um aumento do número de produtos laterais, dificultando a purificação da mistura reaccional por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica]. Num outro ensaio, com as condições experimentais utilizadas na obtenção do aldeído não conjugado (2,6 eq. de DMSO e 1,3 eq de (COCl)₂), tendo o diclorometano como solvente também não se verificou um aumento do rendimento, (Tabela 1, ensaio 7).

Tal como no método de oxidação com o PCC, pensou-se que os grupos amina do abacavir poderiam estar na origem de reacções secundárias. Assim fez-se reagir o *N*-acetil-

abacavir (**44**) segundo as condições de oxidação de Swern e isolaram-se dois produtos por c.c.f.p. [AcOEt, sílica]. A análise por ^1H -RMN dos compostos isolados não revelou a presença de um sinal com o desvio químico característico de um protão de aldeído. Não se aprofundou este método, uma vez que nesta altura do trabalho já se tinham isolado os produtos pretendidos e era mais importante progredir para a investigação da sua reactividade com a presença de bionucleófilos.

2.2.6 - Reacção com trióxido de enxofre e piridina

Paralelamente explorou-se um outro método de oxidação envolvendo a activação da molécula de DMSO, usando como electrófilo o complexo de trióxido de enxofre e piridina ($\text{Py}.\text{SO}_3$, **32**). À partida, a vantagem deste método em relação à oxidação de Swern prende-se essencialmente com um procedimento experimental mais simples, pelo que nos pareceu interessante testar a sua utilização na transformação em estudo. Embora no procedimento experimental inicial se tenha começado a utilizar o DMSO como solvente neste tipo de reacções, ^[47] actualmente muitos autores utilizam o diclorometano como solvente, até para facilitar o tratamento da mistura reaccional. O passo mais importante é a adição da espécie activada ao álcool, que é dependente da temperatura. Inicialmente a reacção era feita à temperatura ambiente, mas verificou-se que a diminuição da temperatura influenciava positivamente o rendimento da reacção. Na literatura estão descritas temperaturas de reacção que variam entre -10°C ^[48] e 0°C ^{[49], [50]}. Efectuaram-se dois ensaios com este método de oxidação.

No primeiro ensaio (descrito em **3.3.2.2**, método I) a solução de $\text{Py}.\text{SO}_3$ em DMSO foi adicionada à solução de abacavir e trietilamina, em diclorometano, a 0°C . A análise da mistura reaccional, por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] mostrou a formação de um produto. No entanto, após purificação por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] o espectro de ^1H -RMN obtido apresentava apenas os sinais correspondentes ao abacavir. Este resultado poder-se-á explicar pelo facto deste complexo de piridina actuar também muitas vezes como agente sulfatante. ^[51] O isolamento cromatográfico, com sílica, do complexo piridínico do abacavir sulfatado poderia provocar a hidrólise deste produto levando à formação de abacavir.

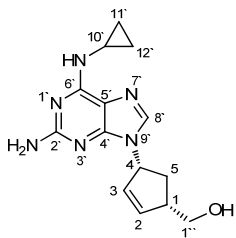
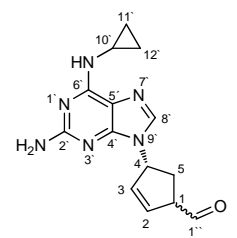
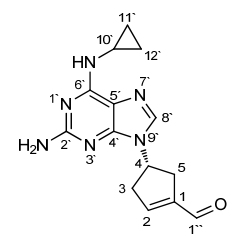
Num segundo ensaio (descrito em **3.3.2.2**, método II) a preparação da espécie activada foi feita com a mistura a 14°C sob agitação, durante 15 minutos. Desta forma pensou-se estar a garantir que todo o complexo $\text{Py}.\text{SO}_3$ reagisse para formar a espécie activada, eliminando a possibilidade de reacção de sulfonação do álcool ou de outros grupos nucleófilos do abacavir,

através da introdução do grupo $-\text{SO}_3^-$. A adição foi feita com a solução de abacavir em diclorometano, a $-13\text{ }^\circ\text{C}$. A análise da mistura reaccional por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] revelou uma mistura complexa mas por revelação com DNP não houve o desenvolvimento de qualquer coloração, o que levou ao abandono desta via de oxidação.

2.3 - Caracterização estrutural dos aldeídos conjugado (**26**) e não conjugado (**25b**)

A caracterização estrutural dos aldeídos conjugado (**26**) e não conjugado (**25b**) foi efectuada por espectrometria de massa e por RMN, com base na análise dos resultados obtidos nas experiências de DEPT e bidimensionais (HMBC, HSQC e COSY). Na Tabela 2 são apresentados os dados espectroscópicos obtidos para o aldeído **26**, para o aldeído **25b** e também para o abacavir. Os espectros de RMN foram adquiridos no mesmo solvente (CDCl_3).

Tabela 2 – Dados espectroscópicos obtidos para o abacavir e para os aldeídos 26 e 25b.

Composto	<div>Abacavir (5)</div> 	<div>Aldeído não conjugado (25b)</div> 	<div>Aldeído conjugado (26)</div> 			
Posição	¹ H-RMN δ(ppm)	¹³ C-RMN δ(ppm)	¹ H-RMN δ(ppm)	¹³ C-RMN δ(ppm)	¹ H-RMN δ(ppm)	¹³ C-RMN δ(ppm)
1''	3,90 (H _{1''a}) 3,79 (H _{1''b})	65,4	9,83	189,0	9,77	189,0
1	3,13-3,10	47,9	3,11-3,07	47,9	-	145,6
2	6,09-6,11	138,3	5,79-5,77	130,8	6,89-6,87	148,8
3	5,76-5,74	130,7	6,11-6,08	137,9	3,23-3,02 (H _{3a}) 2,97-2,88 (H _{3b})	42,3
4	5,43-5,39	61,9	5,47-5,42	61,4	5,16-5,14	52,5
5	2,81-2,74 (H _{5a}) 2,21-2,16 (H _{5b})	32,4	2,81-2,70 (H _{5a}) 2,09-2,00 (H _{5b})	33,1	3,23-3,02 (H _{5a}) 2,97-2,88 (H _{5b})	36,1
8'	7,46	137,2	7,48	136,5	7,38	135,1
4'	-	150,2	-	150,4	-	151,2
5'	-	115,8	-	115,6	-	115,7
2' e 6'	-	159,4 ou 156,6	-	159,8	-	160,2 ou 156,6
10'	2,99-2,94	23,8	2,98-2,94	23,6	2,97-2,88	23,9
11' e 12'	0,85-0,81 (H _{11'a} e H _{12'a}) 0,60-0,57 (H _{11'b} e H _{12'b})	7,6	0,85-0,80 (H _{11'a} e H _{12'a}) 0,62-0,58 (H _{11'b} e H _{12'b})	7,7	0,77-0,75 (H _{11'a} e H _{12'a}) 0,52-0,51 (H _{11'b} e H _{12'b})	7,6
EM (ESI) m/z	287 [MH] ⁺	285 [MH] ⁺ ; 191 [MH ₂ - ciclopent-2-enilcarbaldeído] ⁺	285 [MH] ⁺ ; 191 [MH ₂ - ciclopent-1-enilcarbaldeído] ⁺			

A primeira evidência de formação do aldeído conjugado (**26**) teve como base inicial o reconhecimento do singuleto, no espectro de ^1H -RMN, com desvio químico de 9,77 ppm que integra para 1 próton, correspondente ao próton do aldeído ($\text{H}_{1'}$). Este próton no espectro de HSQC correlaciona com o sinal a 189,0 ppm ($\text{C}_{1'}$), cujo desvio é compatível com a existência de um grupo aldeído na molécula. A comprovação da existência deste grupo funcional na molécula é obtida no espectro de IV onde se observa a 1603 cm^{-1} uma banda intensa correspondente à frequência de vibração da ligação $\text{C}=\text{O}$ em aldeídos α,β -insaturados. Adicionalmente, o espectro de massa, obtido por ionização de *electrospray* apresenta um pico a m/z 285 compatível com a massa da molécula protonada do aldeído **26** e a m/z 191 o fragmento correspondente à perda da unidade de ciclopenteno a partir da molécula protonada.

A atribuição dos restantes sinais da molécula assim como a identificação da ocorrência de isomerização da dupla ligação foi obtida tendo como base as correlações observadas nos espectros de HMBC (Figura 15), HSQC e COSY. Confirmou-se a existência dos prótons do ciclopropilo: os multipletos entre 0,51 ppm e 0,52 ppm e entre 0,75 ppm e 0,77 ppm correspondentes aos quatro prótons nas posições 11' e 12', que apresentam correlações, no espectro de HSQC, com o carbono secundário a 7,6 ppm. No espectro de HMBC observa-se uma correlação a duas ligações com o carbono a 23,9 ppm atribuído ao carbono terciário do ciclopropilo, na posição 10', que apresenta uma correlação no espectro de HSQC com o multipletos entre 2,88 ppm e 2,97 ppm ($\text{H}_{10'}$).

A isomerização da ligação dupla foi confirmada pela alteração dos sinais referentes ao anel de ciclopenteno, quando comparados aos sinais correspondentes a este anel no abacavir. No espectro de ^1H RMN verificou-se a existência de um multipletos entre 3,06 ppm e 3,20 ppm que integra para 4 prótons, atribuídos aos prótons nas posições 3 e 5 do anel. No espectro de HSQC observam-se correlações entre este multipletos e os dois carbonos secundários a 36,1 ppm (C_5) e a 42,3 ppm (C_3). A atribuição do sinal correspondente ao carbono C_5 teve como base a existência de uma correlação a três ligações (no espectro de HMBC) entre este sinal e o sinal correspondente ao próton aldeídico. Este multipletos apresenta ainda correlações, no espectro de HMBC, com o carbono secundário a 145,6 ppm e com o carbono quaternário a 148,8 ppm, correspondentes aos carbonos nas posições 1 e 2, respectivamente. A existência destes dois sinais de carbono comprova só por si a isomerização da ligação dupla. Relativamente ao carbono quaternário na posição 1 (145,6 ppm) do anel de ciclopenteno observa-se uma correlação a 2 ligações, no espectro de HMBC, com o próton do aldeído. O multipletos entre 5,14 ppm e 5,16 ppm, que integra para 1 próton, foi atribuído ao próton na

posição 4 do anel de ciclopenteno, visto apresentar correlação no espectro de COSY, com o multipletto correspondente aos prótons H₃ e H₅. No espectro de HSQC este próton apresenta correlação com o carbono a 52,5 ppm, cujo desvio é compatível com a existência de um carbono terciário ligado a um azoto.

No anel purínico o único próton na posição 8', a 7,38 ppm, apresenta correlação com o carbono a 135,1 ppm, no espectro de HSQC. No espectro de HMBC observa-se uma correlação a 3 ligações com os carbonos quaternários a 115,7 ppm, e 151,2 ppm correspondentes aos carbonos quaternários na posição 5' e 4', respectivamente. Relativamente aos carbonos nas posições 2' e 6' do anel purínico, pelo espectro de ¹³C-RMN e complementar análise do espectro DEPT, observa-se a existência de dois carbonos quaternários a 156,6 ppm e a 160,2 ppm; porém, a inexistência no espectro de HMBC de correlações a 3 ligações, destes carbonos com qualquer próton na molécula impede a atribuição inequívoca destes sinais.

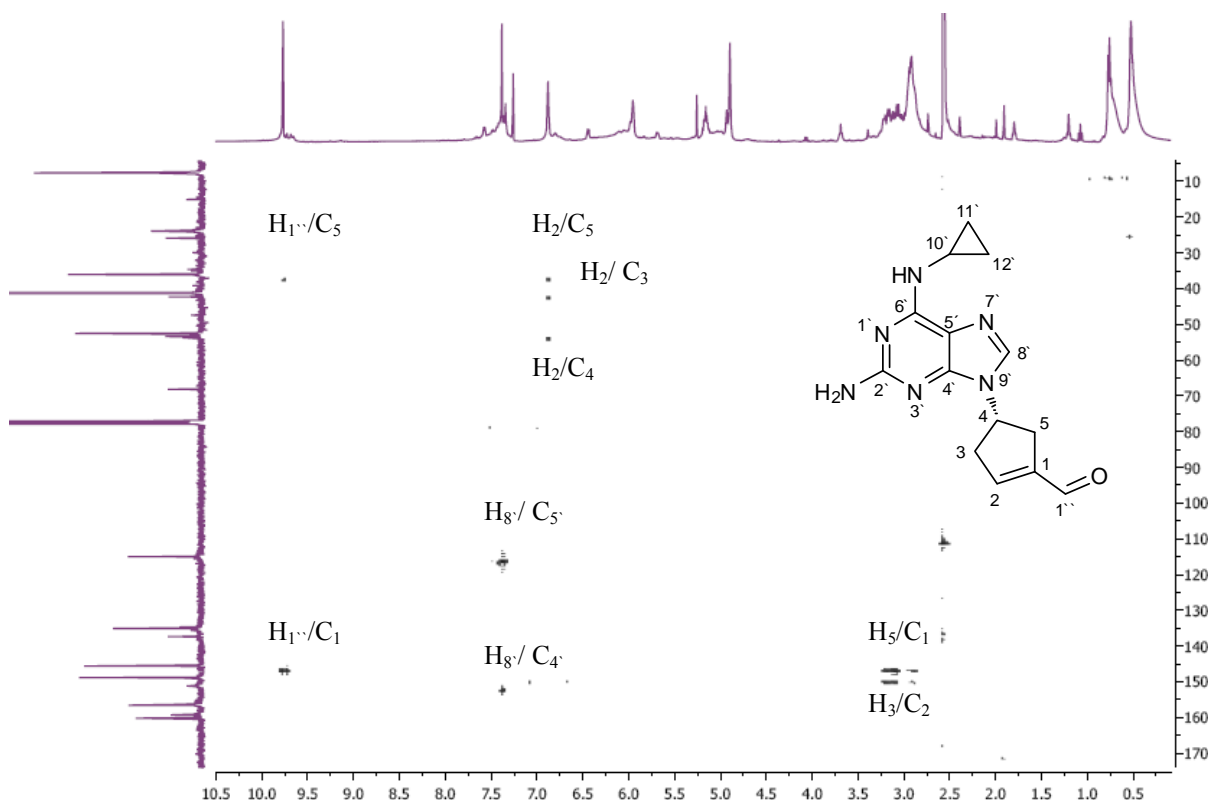


Figura 15 – Espectro de HMBC do aldeído conjugado (26).

Tal como na caracterização estrutural do aldeído conjugado (26), a primeira evidência de formação do aldeído não conjugado (25b) teve como base inicial o reconhecimento do singuleto a 9,83 ppm (H_{1''}) característico do próton aldeídico, que apresenta correlação, no espectro de HSQC com o carbono a 189,0 ppm. A atribuição dos prótons do ciclopropilo e do anel purínico foi feita de forma idêntica à apresentada para o aldeído conjugado. A confirmação da existência de uma dupla ligação não conjugada com o grupo aldeído foi obtida

pela existência, no espectro de ^1H RMN, de dois sinais entre 5,77 ppm e 5,79 ppm e entre 6,08 ppm e 6,11 ppm que correlacionam no espectro de HSQC com os carbonos terciários a 130,8 ppm e a 137,9 ppm respectivamente, compatíveis com a existência de uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 do anel de ciclopenteno. A atribuição do sinal correspondente à posição 2 da ligação dupla (entre 5,77 ppm e 5,79 ppm) foi feita com base na correlação observada, pelo espectro de COSY, com o multipletto entre 3,07 ppm e 3,11 ppm atribuído ao próton na posição 1 do anel de ciclopenteno, que no espectro de HSQC apresenta uma correlação com o carbono a 47,9 ppm. No espectro de COSY este multipletto apresenta ainda correlação com os prótons na posição 5 (entre 2,0 e 2,81 ppm) do anel de ciclopenteno.

Relativamente aos dois prótons na posição 5 do anel de ciclopenteno foram atribuídos aos dois multipletos entre 2,00 ppm e 2,09 ppm e entre 2,70 ppm e 2,81 ppm, que apresentam correlação no espectro de HSQC com o carbono secundário a 33,1 ppm.

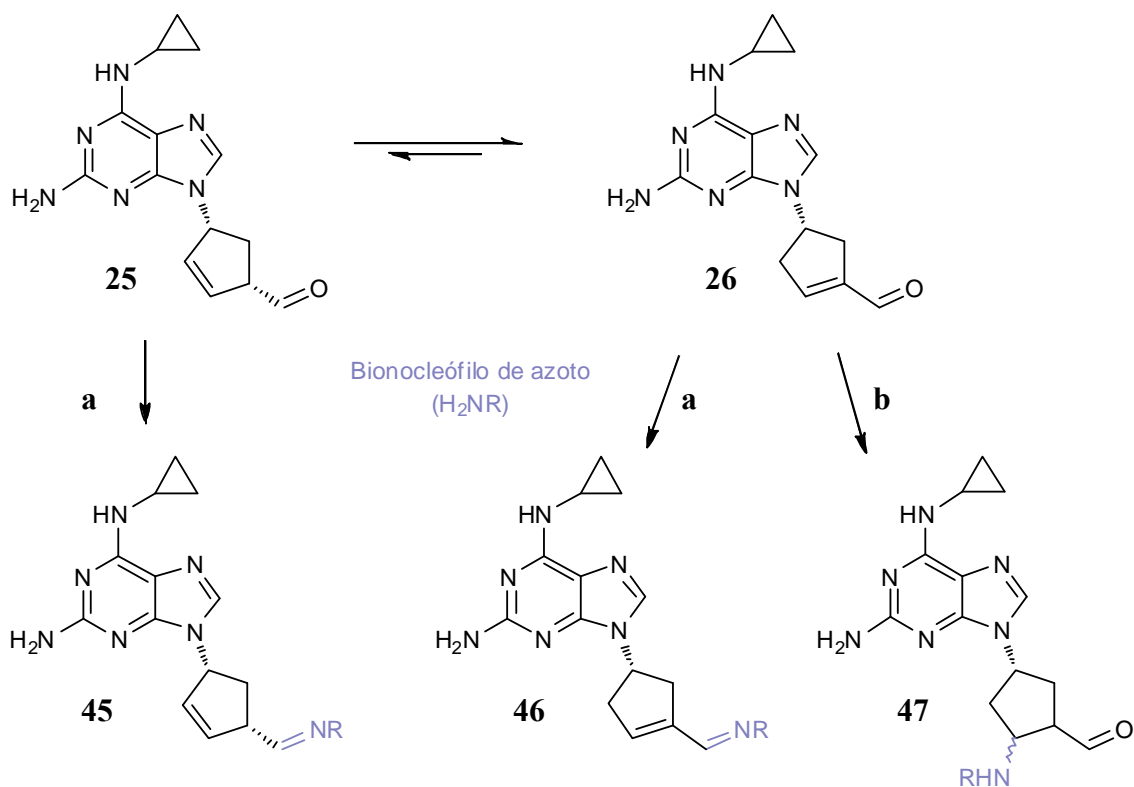
O espectro de massa obtido por ionização de *electrospray* para este produto foi idêntico ao obtido para o aldeído conjugado, apresentando um pico a m/z 285 compatível com a massa da molécula protonada do aldeído **25b** e a m/z 191 o fragmento correspondente à perda da unidade de ciclopent-1-enilcarbaldeído a partir da molécula protonada.

2.4 - Reacção dos aldeídos derivados do abacavir com bionucleófilos

A formação de aductos, a partir dos aldeídos derivados do abacavir, pode ocorrer através da aminação redutiva, com o ataque do nucleófilo ao grupo carbonilo seguido de redução ou por adição de Michael, com o ataque do nucleófilo à ligação dupla conjugada com o grupo carbonilo (Esquema 15). No primeiro caso, de modo semelhante ao que ocorre em sistemas biológicos, a reacção entre aldeídos e nucleófilos leva à formação de iminas (bases de Schiff).^[27] Devido à sua instabilidade e consequente possibilidade de reverter ao material de partida, armadilham-se estes compostos sob a forma de aminas, através da redução da imina. O cianoboro-hidreto de sódio (NaBH_3CN) foi o redutor utilizado para a formação da amina correspondente, devido à elevada selectividade na redução de iminas.^[52] Por outro lado, dada a formação do aldeído α,β -insaturado, existe a possibilidade da reacção ocorrer através da adição do nucleófilo à ligação dupla do aldeído conjugado (**26**). Por isto, em alguns ensaios não se adicionou o redutor após a incubação do aldeído com o nucleófilo.

Num sistema α,β -insaturado a adição de nucleófilos pode dar-se segundo a adição 1,4 (adição de Michael) ou adição 1,2 (ao carbonilo), dependendo de factores como a natureza do composto α,β -insaturado, as condições reaccionais ou o tipo de nucleófilo. Em geral, em compostos α,β -insaturados aldeídicos a adição directa ao carbonilo é favorecida dando origem ao chamado produto cinético. No entanto, na presença de nucleófilos moles (como os nucleófilos de enxofre, glutatona e *N*-acetil-cisteína) não é de descartar a possibilidade de formação do chamado produto termodinâmico, que resulta da adição conjugada à ligação dupla.^[53]

Com nucleófilos de azoto (ex. lisina e valinato de etilo), sendo estes nucleófilos de “fronteira”, colocava-se a hipótese de que para além do produto cinético, que resulta na formação de uma base de Schiff (**46**, Esquema 15),^[51] poderia também ocorrer a formação do produto termodinamicamente mais estável (**47**), nomeadamente em ensaios com tempos de incubação mais longos e com temperatura mais elevada.



Esquema 15 – Esquema reaccional da formação de aductos com bionucleófilos de azoto pelo mecanismo de base de Schiff (a) ou por adição de Michael (b).

2.4.1 - Reacção com a lisina

O baixo rendimento de obtenção do aldeído conjugado (**26**), poderá ter sido devido ao processo de purificação, que envolve c.c.f.p. [$CH_2Cl_2/MeOH$ (1:0,1)]. Assim, averiguou-se utilizando as misturas reaccionais provenientes da reacção de oxidação do abacavir pelo método de Swern, com trietilamina, se haveria alguma indicação da formação de aductos. Na reacção de formação do aducto com a lisina efectuaram-se vários ensaios testando-se a influência do número de equivalentes de lisina e de $NaBH_3CN$ adicionados e do tempo de incubação. Num primeiro ensaio (descrito em 3.4.1.2, método I) utilizaram-se 4 eq. de lisina em tampão fosfato pH 7,4, 50 mM, à qual foi adicionada uma solução da mistura reaccional proveniente da reacção de oxidação do abacavir pelo método de Swern; após 0,5 horas de reacção adicionaram-se 4 eq. de $NaBH_3CN$. Isolou-se por HPLC semi-preparativo o produto correspondente ao sinal mais intenso a $t_r = 10,6$ min., que foi analisado por 1H -RMN, mas devido à quantidade reduzida de amostra não foi possível a análise por esta técnica. No entanto, através da análise por LC-MS (ESI) do composto purificado, foi possível obter-se evidência da formação do aducto com a lisina (**48**), tendo-se obtido um espectro de massa com

um sinal a m/z 415, compatível com a massa da molécula protonada do aducto resultante da redução da base de Schiff formada por adição directa da lisina ao carbonilo do aldeído formado na reacção de Swern. O espectro de massa obtido por LC-MS (ESI) apresenta ainda a m/z 286 o pico correspondente a um fragmento formado por quebra da ligação NH-C com saída da unidade de lisina, a partir do ião molecular, e a m/z 208, o sinal correspondente à molécula diprotonada, como representado na Figura 16. Estes resultados, contudo, não nos permitem saber qual dos grupos amina da lisina atacou o carbonilo para formar o aducto.

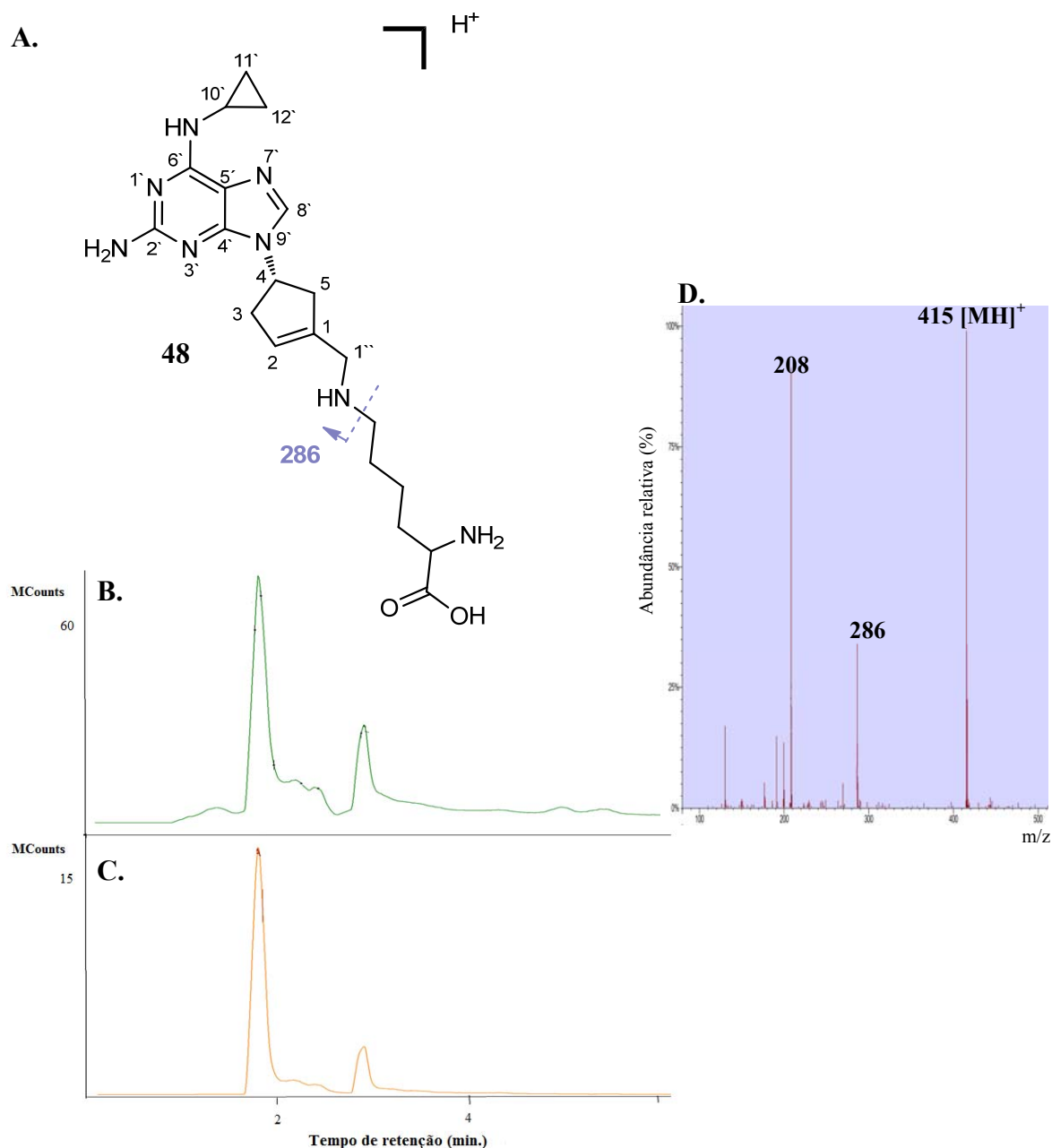


Figura 16 – Análise por LC-MS (ESI) da mistura reaccional da lisina modificada com o aldeído obtido por oxidação de Swern após tratamento com NaBH_3CN A. Representação esquemática da fragmentação, B. cromatograma iónico total da mistura reaccional, C. cromatograma iónico extraído (m/z 415) e D. espectro de massa do aducto com a lisina (48).

Num outro ensaio (descrito em **3.4.1.2**, método II) testou-se a reacção para a formação do aducto com a lisina utilizando-se um menor excesso de lisina (1,5 eq.), tendo-se adicionado 0,2 eq. de NaBH_3CN , após 0,5 horas de reacção. A mistura foi analisada por LC-MS verificando-se novamente um pico cujo espectro de massa indicava a formação do aducto. No entanto, devido à complexidade da mistura obtida e/ou reduzido rendimento de formação do aducto, não foi possível o isolamento do aducto por HPLC semi-preparativo. Assim, decidiu-se proceder à reacção de formação do aducto com o aldeído conjugado **26**, previamente isolado por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1)], de forma a simplificar a separação cromatográfica da mistura reaccional final.

De referir que os ensaios discutidos anteriormente, assim como todos os ensaios para a formação de aductos partindo de misturas reacionais, foram efectuados tendo em conta algumas aproximações no cálculo do número de equivalentes do aminoácido e do agente redutor, relativamente ao material de partida. Para facilitar a compreensão dos vários ensaios, relativos às reacções de oxidação descritos na parte experimental, decidiu-se apresentar o número de equivalentes considerando a conversão total do material de partida em aldeído.

Posto isto, e de modo a clarificar as condições experimentais para a obtenção do aducto com a lisina, realizou-se um ensaio com o aldeído conjugado (**26**). Neste ensaio (descrito em **3.4.1.2**, no método III) utilizaram-se 8 eq. de lisina. Por LC-MS, identificou-se novamente o sinal cujo espectro de massa é compatível com a formação do aducto com a lisina (**48**). No entanto, mais uma vez não foi possível isolar o aducto. Nestes ensaios para a obtenção do aducto com a lisina nunca foi detectado qualquer sinal cujo espectro de massa indicasse a formação do aducto pelo mecanismo de Michael.

Alternativamente, e para evitar a competição da reacção do grupo α -amino da lisina pelo nucleófilo, realizou-se um ensaio (descrito em **3.4.1.3**) com a Fmoc-lisina. No entanto, pela análise por LC-MS da mistura reaccional não se teve qualquer indicação da formação do aducto pretendido. Tal facto poder-se-á dever à ocorrência de reacções laterais entre o redutor e o grupo protector da lisina, que foram comprovadas pela monitorização por HPLC de um ensaio em que se fez reagir a Fmoc-lisina com o redutor na ausência de electrófilo.

2.4.2 - Reacção com a *N*-acetil-cisteína e com a glutatona

Após a evidência da formação de aductos segundo um mecanismo de base de Schiff, resolveu-se recorrer à utilização de nucleófilos moles como a *N*-acetil cisteína e a glutatona, de modo a favorecer a formação de aductos segundo o mecanismo de adição Michael.

No ensaio (descrito em 3.4.1.4, ensaio 1) realizado com a *N*-acetil cisteína (1 eq.) em tampão Tris pH 7,4, 50 mM, à qual se adicionou a mistura reaccional obtida a partir da oxidação de Swern, não se observou por LC-MS(ESI) qualquer indicação da formação do aducto pretendido. Assim, de modo a minimizar a complexidade da mistura reaccional, realizaram-se outros dois ensaios a partir do aldeído conjugado (26) previamente isolado por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1)], em que se aumentou o número de equivalentes de *N*-acetil cisteína, a temperatura de incubação (de t.a. para 37°C) e o tempo de incubação, tendo-se efectuado dois ensaios com 24 ou 75 horas de reacção (descritos em 3.4.1.4, ensaio 2 e 3). No entanto, mais uma vez na análise da mistura reaccional por LC-MS não se identificaram sinais cujos espectros de massa fossem compatíveis com o aducto.

Na incubação com a glutatona (4,0 eq.) em tampão fosfato pH 7,4, 50 mM, à qual se adicionou uma solução do aldeído conjugado (26) previamente isolado por c.c.f.p. também não foi possível a detecção por LC-MS do aducto correspondente.

Estes resultados parecem indicar que mesmo na presença de nucleófilos moles, não é provável que ocorra a formação de aductos provenientes da adição 1,4 à ligação dupla do aldeído conjugado (26).

2.4.3 - Reacção com o valinato de etilo e com a Hemoglobina Humana

À semelhança do que já havia sido efectuado com os outros bionucleófilos, os primeiros ensaios de incubação com o valinato de etilo foram efectuados utilizando as misturas reacionais obtidas após a oxidação de Swern do abacavir. De todos os ensaios efectuados (descritos em 3.4.1.1, no método I), que envolveram a modificação de vários parâmetros experimentais como o número de equivalentes de amino ácido e de redutor, aquele em que a mistura reaccional de Swern foi obtida após tratamento aquoso, usando 0,71 eq. de valinato de etilo, com 30 minutos de incubação seguido de adição de NaBH_3CN , originou um produto identificado por LC-MS, cujo espectro de massa é compatível com o aducto com o valinato de etilo (49), proveniente da formação de base de Schiff, com intensidade máxima.

O espectro de massa obtido apresenta a m/z 414, correspondente ao aducto protonado, e a m/z 286 e 191 os fragmentos formados a partir da molécula protonada por perda de *i*-Pr-CCOOEt e perda conjunta das unidades de ciclopenteno e valinato de etilo, respectivamente. A m/z 269 é ainda observável o pico correspondente ao do fragmento proveniente da perda do valinato de etilo, a partir da molécula protonada, como representado na Figura 17. De referir que nunca se teve qualquer indicação por LC-MS, da formação do produto proveniente de adição de Michael à ligação dupla do aldeído conjugado.

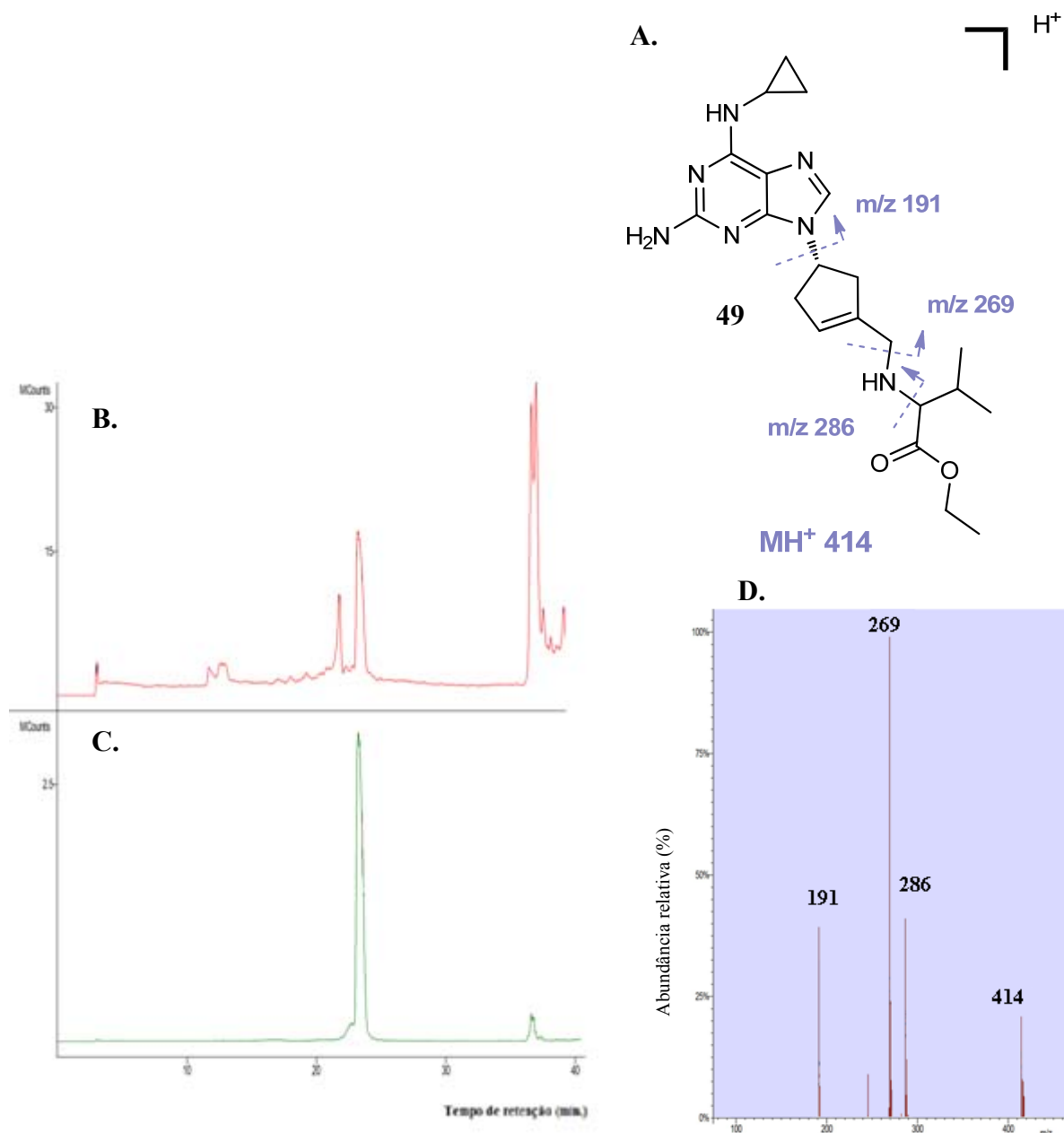
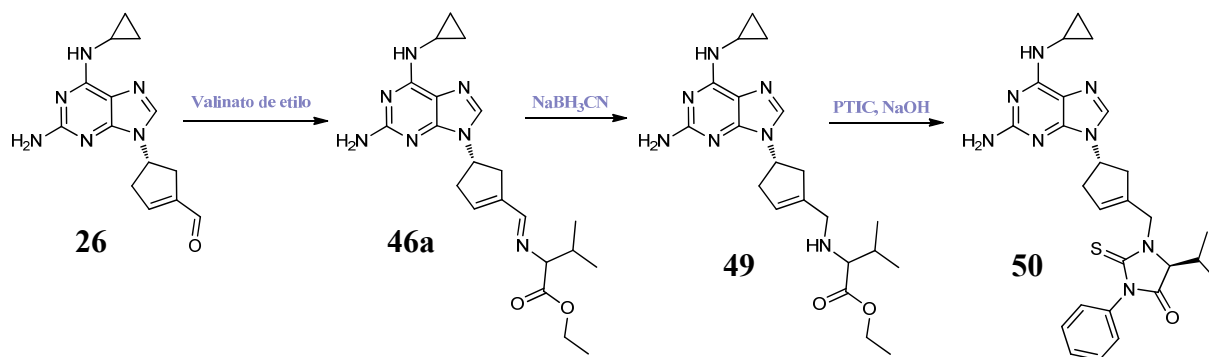


Figura 17 - Análise por LC-MS (ESI) da mistura reaccional do valinato de etilo modificado com o aldeído 26 obtido por oxidação de Swern após tratamento com $NaBH_3CN$ A. Representação esquemática da fragmentação, B. cromatograma iónico total da mistura, C. cromatograma iónico extraído (m/z 414) e D. espectro de massa do aducto com o valinato de etilo (49) .

Dada a possibilidade de formação de hidrato do aldeído em solução aquosa, testou-se a possibilidade de formação de aducto em meio não aquoso usando como solvente o THF. No entanto, a dificuldade em dissolver a mistura reaccional de Swern em THF e o facto do sinal, obtido por LC-MS, correspondente ao aducto com o valinato de etilo **49** ter sido mais intenso no ensaio de incubação em solução de tampão fosfato pH 7,4, 50 mM, do que em THF levou à utilização desta solução tampão para a dissolução do aminoácido em todos os ensaios seguintes.

A mistura reaccional obtida após incubação da mistura reaccional de Swern com o valinato de etilo mostrou sempre ser muito complexa, dificultando o isolamento do aducto. Assim, de forma a simplificar a mistura reaccional final, passaram-se a efectuar as incubações do valinato de etilo com o aldeído puro, previamente isolado por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1)] e no final da incubação, após adição de NaBH_3CN , passou-se a submeter a mistura obtida às condições de degradação de Edman, envolvendo a derivatização com fenilisotiocianato (PTIC), em meio básico, para dar uma tio-hidantoína (**50**, Esquema 16). Este procedimento levou à simplificação da mistura obtida. Isto porque uma vez derivatizado o aducto (aducto de Edman, **50**) passou a ser solúvel em solventes orgânicos simplificando a mistura reaccional, e foi possível isolá-lo por HPLC semi-preparativo.



Esquema 16 - Esquema reaccional dos passos reaccionais para a formação do aducto sob a forma de hidantoína.

Em todos os ensaios efectuados nestas condições, uma solução em THF, do aldeído previamente isolado, foi adicionada a uma solução de valinato de etilo (4,0 eq.) em tampão fosfato pH 7,4, 50 mM (Tabela 3). Nestes ensaios variou-se o tempo de incubação, tendo-se efectuado ensaios com 0,5h, 1h e 2h de incubação. Por LC-MS observou-se, que o rendimento de formação do aducto diminuía com o aumento do tempo de incubação, sendo máximo no ensaio em que o aldeído foi incubado 0,5 horas com o valinato de etilo (Tabela 3, ensaios A, B e C). Estudou-se também o efeito da variação do número de equivalentes de NaBH_3CN

(Tabela 3, ensaio D vs E e F vs G), tendo-se observado que esta variação não afectou o rendimento de formação de aducto. Assim, quando se efectuou um ensaio em que o aldeído conjugado (**26**) foi incubado durante 0,5 horas com valinato de etilo, seguido de adição de NaBH₃CN (11 eq.) e da degradação de Edman (Tabela 3, ensaio H), foi possível isolar por HPLC semi-preparativo o produto correspondente ao aducto de Edman (**50**) a t_R = 11,29 min., com um rendimento de 15% (2,1 mg).

Tabela 3 - Condições experimentais dos ensaios da reacção para a formação do aducto com o valinato de etilo após degradação de Edman.

Ensaio	NaBH ₃ CN (eq.)	Tempo (horas)	Observações
A	7,2	0,50	+++ ^a
B	7,2	1,00	++ ^a
C	7,2	2,00	+ ^a
D	2,8	3,00	+ ^a
E	18,0	3,00	+ ^a
F	2,8	19,45	+ ^a
G	18,0	19,45	+ ^a
H	11,0	0,50	Produto isolado (50) η = 15 %
I	11,0	0,50	Produto isolado (50) η = 3 %

^a Intensidade relativa do sinal observado por LC-MS.

As mesmas condições experimentais foram utilizadas na incubação do aldeído não conjugado (**25b**), (Tabela 3, ensaio I), com o valinato de etilo e tratamento com PTIC em meio básico (degradação de Edman). A purificação da mistura reaccional por HPLC semi-preparativo permitiu o isolamento do aducto de Edman (**50**) com um rendimento de 3% (0,5 mg).

A análise por LC-MS das duas misturas reaccionais (provenientes das incubações com os aldeídos **26** e **25b**) mostra claramente que o aducto maioritário é o **50**, embora a tempo de retenção superior a este aducto apareça um sinal (em ambos os casos minoritário) que apresenta um espectro de massa muito semelhante ao do aducto **50**. Este aducto poderá ser o isómero do aducto **50** com a ligação dupla na posição 2 e 3 do anel ciclopenteno. Tentou-se isolar o produto correspondente a este sinal, no entanto por ¹H-RMN observaram-se apenas os sinais correspondentes à tio-hidantoína não modificada com abacavir.

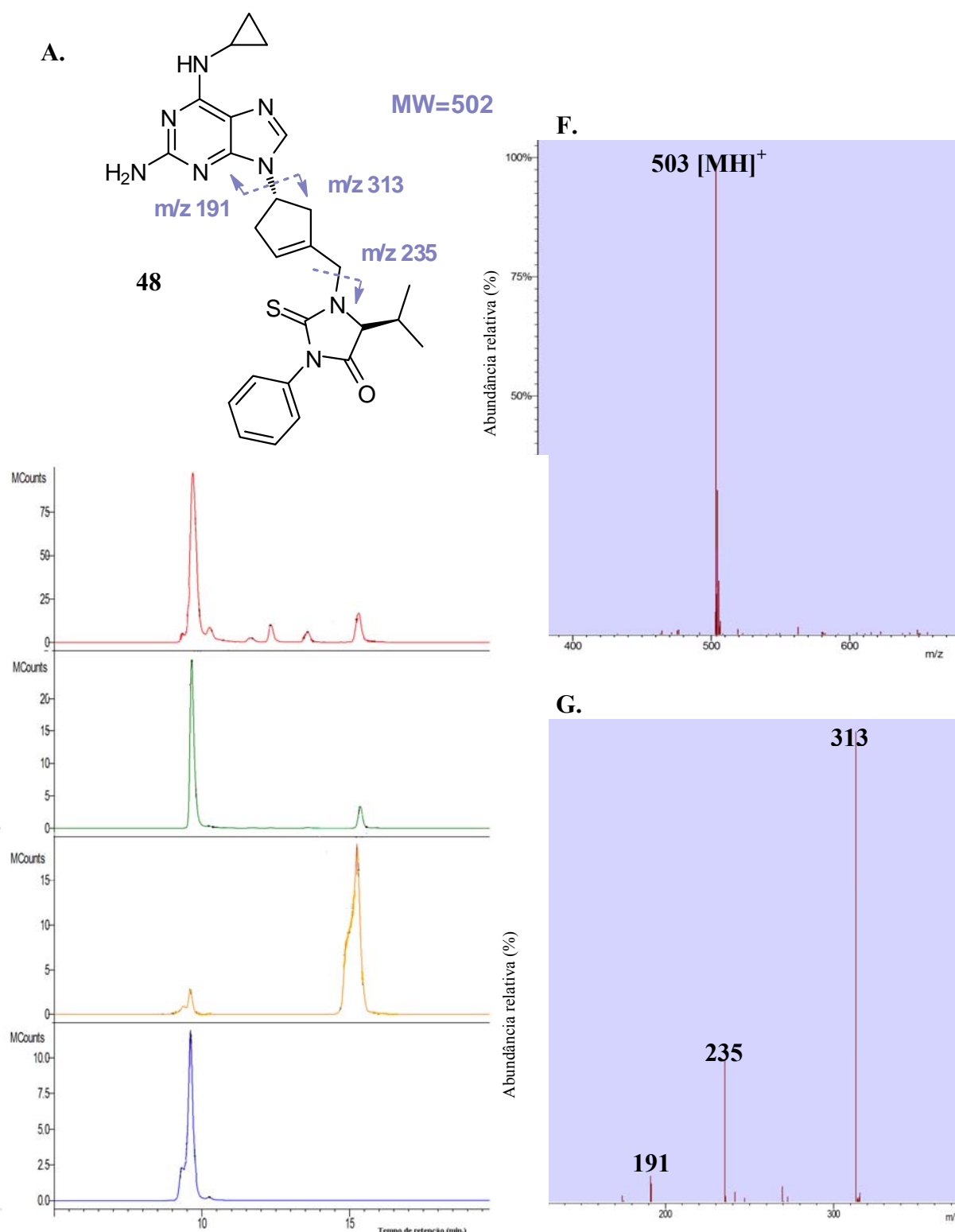


Figura 18 - A. Representação esquemática da fragmentação do aduto de Edman (50). Cromatogramas iônicos obtidos por LC-MS² (ESI) do íon m/z 503 de: B. mistura reaccional resultante da incubação do valinato de etilo com o aldeído conjugado (26); C. mistura reaccional resultante da incubação do valinato de etilo com o aldeído conjugado (25a); D. produto isolado a T_R=16 min.; aduto padrão 50. F. espectro de massa dos produtos com T_R= 11,29 min. e T_R= 16 min. G. espectro de massa dos dois adutos, obtido por LC-MS²(ESI) do íon m/z 503.

Apesar de Walsh *et al* ^[27] reportarem a possibilidade da formação dos dois aldeídos *in vivo*, estes resultados indicam que a isomerização do aldeído não conjugado com formação do conjugado, ocorre em solução antes da reacção com nucleófilos. O facto dos dois aldeídos terem por HPLC tempos de retenção muito semelhantes não permitiu o estudo cinético da isomerização destes dois compostos.

Paralelamente, efectuaram-se ensaios onde se pretendia promover a modificação da Hemoglobina (Hb) com o aldeído conjugado (**26**) (descritos em **3.4.3**). Tal como nas experiências de modificação do valinato de etilo começou-se por utilizar a mistura reaccional obtida após oxidação de Swern, na incubação com a Hb, em tampão fosfato pH 7,4, 0,1 M. Realizaram-se vários ensaios em que se variou o tempo de incubação, retirando-se aliquotas de 30 em 30 minutos, durante 3,5 horas e a aliquota final foi retirada passadas 24 horas. Cada aliquota foi tratada com NaBH₃CN (2,0 eq.), evaporada à secura. Seguiu-se o tratamento com PTIC e NaOH (condições para a degradação de Edman). A solução resultante foi extraída com acetato de etilo e posteriormente a fase orgânica foi analisada por LC-MS. Estes ensaios mostraram, tal como havia sido observado na incubação com valinato de etilo, que a intensidade do sinal correspondente ao aducto de Edman (**50**) diminui com o aumento do tempo de incubação (Figura 19). Nestes ensaios foi mais uma vez observado, que o número de equivalentes de NaBH₃CN não altera o rendimento de formação do aducto.

Efectuaram-se também incubações do aldeído previamente isolado por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1)] com a Hb que após degradação de Edman resultaram na formação do mesmo aducto obtido. Uma vez que as condições experimentais utilizadas nas incubações com o aldeído isolado e com a mistura reaccional não foram exactamente iguais, não se pode concluir em qual dos procedimentos o aducto se formou com maior rendimento.

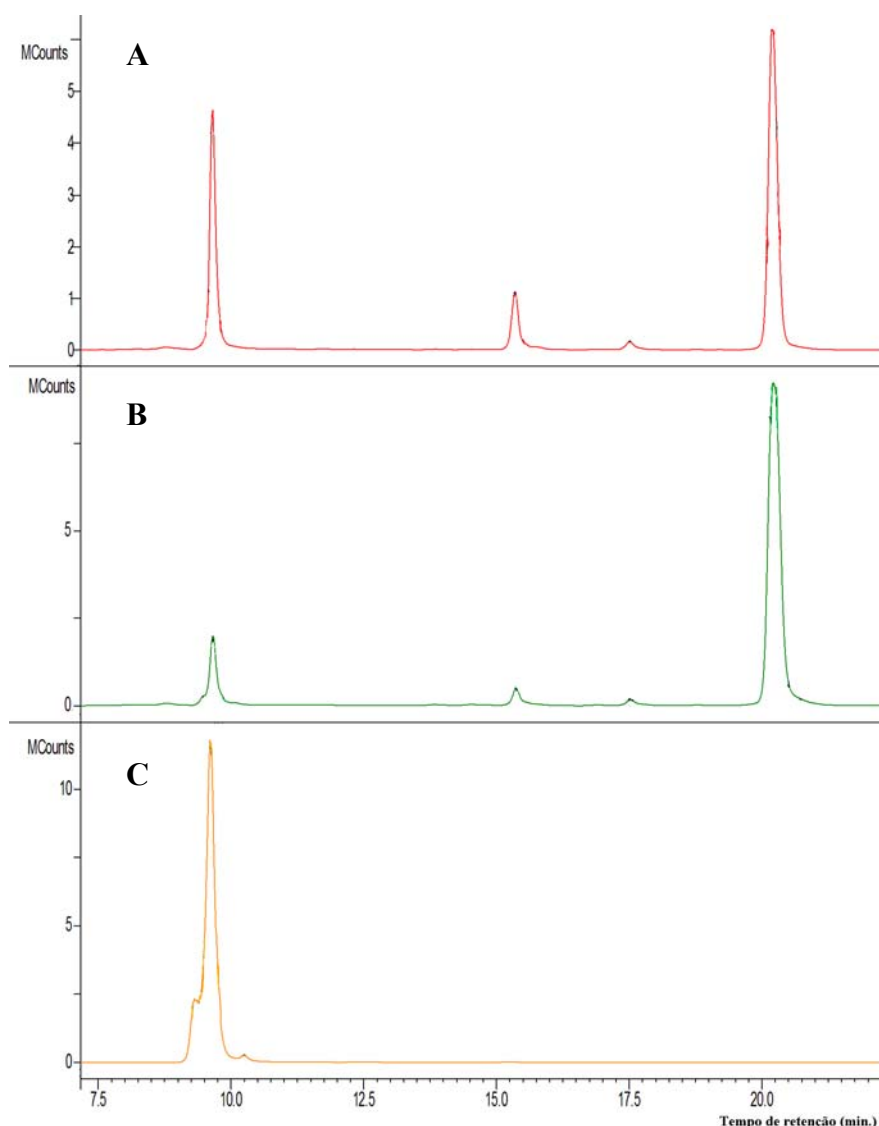


Figura 19 - Cromatogramas iônicos obtidos por LC-MS² (ESI) do íon m/z 503 de: mistura reaccional da hemoglobina modificada com 30 min. (A) e 1 h (B) de incubação, após degradação de Edman; C. aducto padrão 50.

2.4.3.1 - Caracterização estrutural do aducto de Edman (50)

A derivatização do aducto com o valinato de etilo (**49**) que leva à formação da hidantoína no aducto **50** é facilmente identificada no espectro de ¹H-RMN (Figura 20) por um multipletto entre 7,41 ppm e 7,49 ppm (que integra para 3 prótons) e por um dupletto a 7,23 ppm (que integra para 2 prótons), característicos de prótons aromáticos correspondentes às posições *para* e *meta*, e *orto* do anel aromático, respectivamente. Estes prótons apresentam correlações, no espectro de HSQC com os carbonos terciários a 128,5 ppm e 128,6 ppm. O multipletto atribuído aos prótons na posição *meta* e *para* do anel aromático apresenta ainda correlação, no espectro de HMBC com o carbono quaternário a 133,9 ppm atribuído ao carbono na posição 9'' do anel aromático.

A formação da hidantoína é ainda comprovada no espectro de ^{13}C -RMN, pela existência de dois sinais com desvios químicos a campo mais baixo correspondentes aos carbonos quaternários dos grupos C=S (183,0 ppm) e C=O (172,5 ppm).

Os dois dupletos a 0,94 ppm e a 1,24 ppm, foram atribuídos aos 6 prótons dos grupos metilo ($\text{H}_{8''}$) da hidantoína, que apresentarem correlação, no espectro de HSQC com os dois carbonos primários a 16,4 ppm e a 14,6 ppm. No espectro de HMBC observa-se ainda a correlação a 3 ligações com o carbono na posição 6'' (66,2 ppm) da unidade de hidantoína. O multipletto entre 2,47 ppm e 2,55 ppm foi atribuído ao próton terciário do grupo isopropilo ($\text{H}_{7''}$) desta unidade, uma vez que apresenta correlação, no espectro de COSY, com os prótons nas posições 8'' e 6''.

Relativamente aos dois prótons na posição 1'' da unidade derivada do abacavir, que foram atribuídos aos multipletos entre 5,14 ppm e 5,17 ppm e entre 4,26 ppm e 4,27 ppm, (que apresentam, por HSQC correlação com o carbono secundário a 44,5 ppm) observa-se um desvio para campo mais alto destes sinais, relativamente aos correspondentes na molécula de abacavir, o que é perfeitamente compatível com a formação do aducto de Edman, uma vez que no abacavir este carbono está ligado a um oxigénio, que por ser mais electronegativo do que o azoto (heteroátomo ligado a esta posição no aducto de Edman) deverá estar mais desblindado. Estes dois multipletos, apresentam ainda correlação a 2 ligações, no espectro de HMBC com o carbono quaternário a 137,0 ppm correspondente à posição 1 do anel de ciclopenteno e ainda correlação a 3 ligações com o sinal de carbono a 183,0 ppm (C=S) e a 126,8 ppm (C_2) (Figura 21).

Os restantes sinais foram atribuídos de forma análoga à descrição apresentada na caracterização estrutural do aldeído conjugado (**26**).



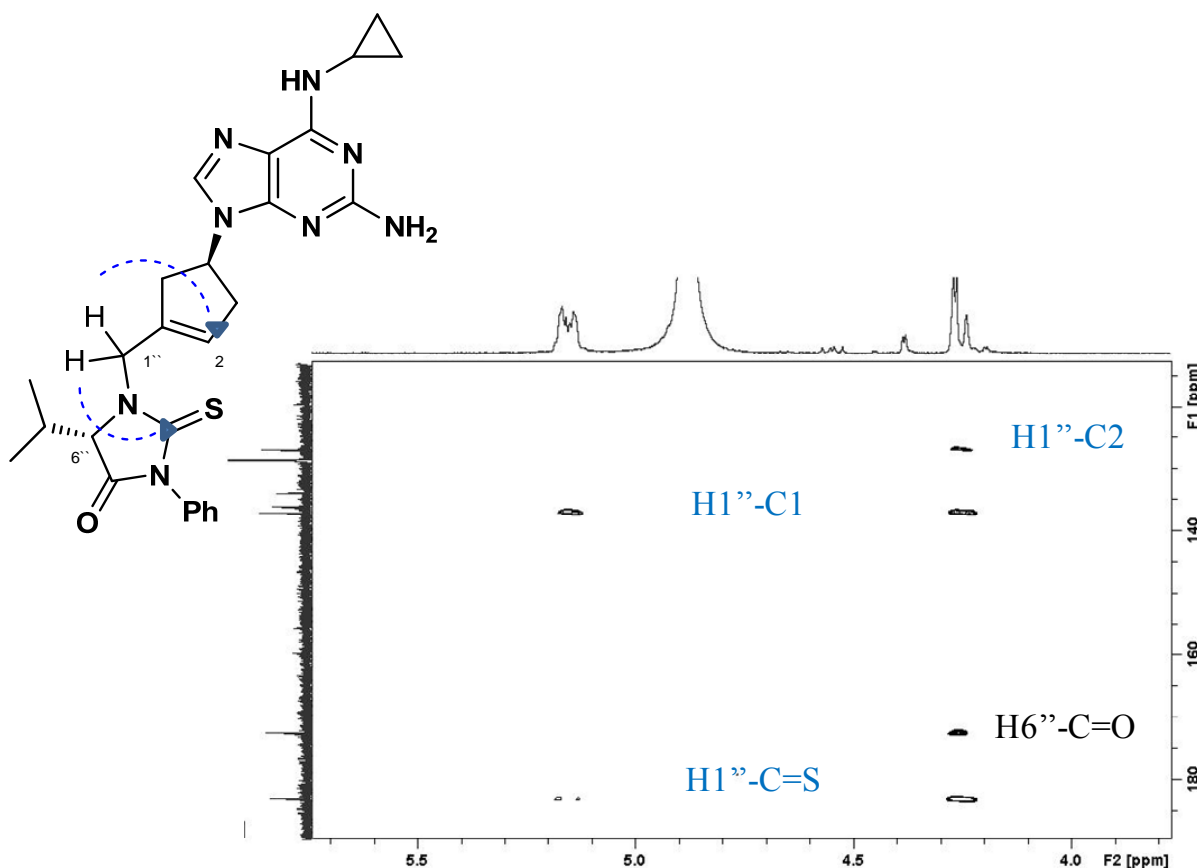


Figura 21 - Ampliação do espectro de HMBC obtido para o aducto de Edman (**50**), destacando-se as correlações a 3 ligações (H-C) dos sinais atribuídos aos prótons na posição 1'' (a azul).

O espectro de massa obtido por LC-MS (ESI) apresenta a massa correspondente à molécula protonada a m/z 503 compatível com a presença do aducto **50**. No espectro de massa obtido por LC-MS-MS observam-se os sinais de fragmentação do aducto protonado a m/z 235, 313 e 191 correspondentes à perda da unidade de hidantoína, do anel de ciclopenteno com a hidantoína e do anel purínico com o ciclopropilo, respectivamente, (Figura 18).

2.4.4 - Modificação da albumina do soro humano com o aldeído conjugado (**26**)

A modificação da albumina do soro humano (HSA) com electrófilos resulta na formação de aductos com diversos resíduos nucleófilos, incluindo a cisteína, a lisina e a histidina. Neste ensaio procurou-se alguma indicação da formação do aducto com a lisina, por comparação por LC-MS com a mistura reaccional obtida por reacção do aldeído conjugado com a lisina, onde houve indicação de formação de aducto.

Para a modificação da HSA com o composto **26** seguiram-se dois procedimentos experimentais diferentes: num procedimento incubou-se a HSA a 37°C na presença de 1,0 eq

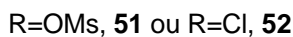
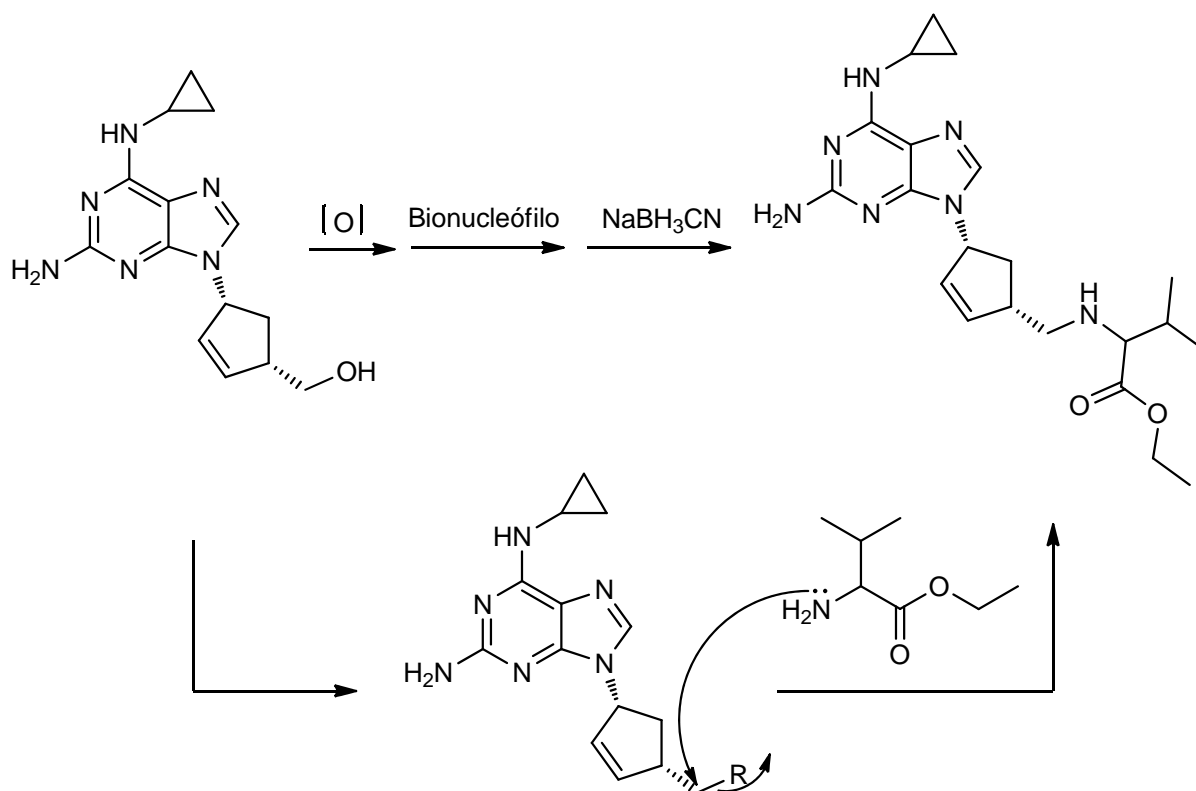
de **26** e após 30 minutos adicionaram-se 4,0 eq. NaBH_3CN seguido de incubação a 37°C durante a noite (descrito em **3.4.4**, método I); no segundo procedimento na ausência de NaBH_3CN , a HSA na presença de **26** foi incubada a 37°C durante a noite (descrito em **3.4.4**, método II). Em ambos os casos, após o período de incubação foi utilizada a hidrólise enzimática com pronase E e leucina aminopeptidase (LAP) com incubação a 37°C durante 20 horas. A pronase E é o nome dado ao conjunto de, pelo menos, dez enzimas proteolíticas, que lhe conferem um largo espectro de actividade, útil quando se pretende uma hidrólise completa a aminoácidos. A enzima LAP hidrolisa sequencialmente o terminal amino dos resíduos de aminoácidos numa cadeia polipeptídica complementando assim, a acção hidrolítica da pronase E e garantindo a hidrólise total da HSA modificada.^[54] No entanto, nestes ensaios de hidrólise enzimática não se conseguiu identificar por LC-MS (ESI) o aducto com a lisina (**48**), tanto na análise da solução final como numa fracção de metanol purificada por *sep-pack* RP-18.

2.4.5 - Reacção com a 2'-desoxiguanosina

Paralelamente realizaram-se alguns ensaios de incubação de 1 eq. de 2'-desoxiguanosina (dG) com misturas reaccionais provenientes da reacção de oxidação pelo método de Swern. A reacção entre aldeídos α,β -insaturados e os grupos nucleófilos da cadeia de DNA é uma das principais causas de mutações ao nível do DNA. A dG está associada à formação de vários aductos através da reacção com estes electrófilos, segundo o mecanismo de Michael ou pela formação de bases de Schiff.^{[55], [56]} Assim, em alguns ensaios adicionou-se NaBH_3CN (1,0 eq.) após 1 hora de reacção. No entanto a análise das misturas reaccionais com ou sem tratamento com NaBH_3CN , por LC-MS não indicou, em qualquer dos ensaios, a formação de nenhum aducto com a dG.

2.4.6 - Reacção de outros derivados do abacavir com bionucleófilos

Através de métodos que não pretendiam mimetizar os processos que ocorrem *in vivo*, tentou-se a formação de aductos a partir de outros derivados do abacavir (Esquema 17). Na literatura está descrita a reacção de bionucleófilos, por um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$, com um derivado do NNRTI nevirapina, a 12-mesiloxi-nevirapina que conduziu à formação de padrões de aductos que haviam sido detectados *in vivo*.^[33]



Esquema 17 - Esquema reaccional para a formação do aducto com o valinato de etilo por um mecanismo S_N2.

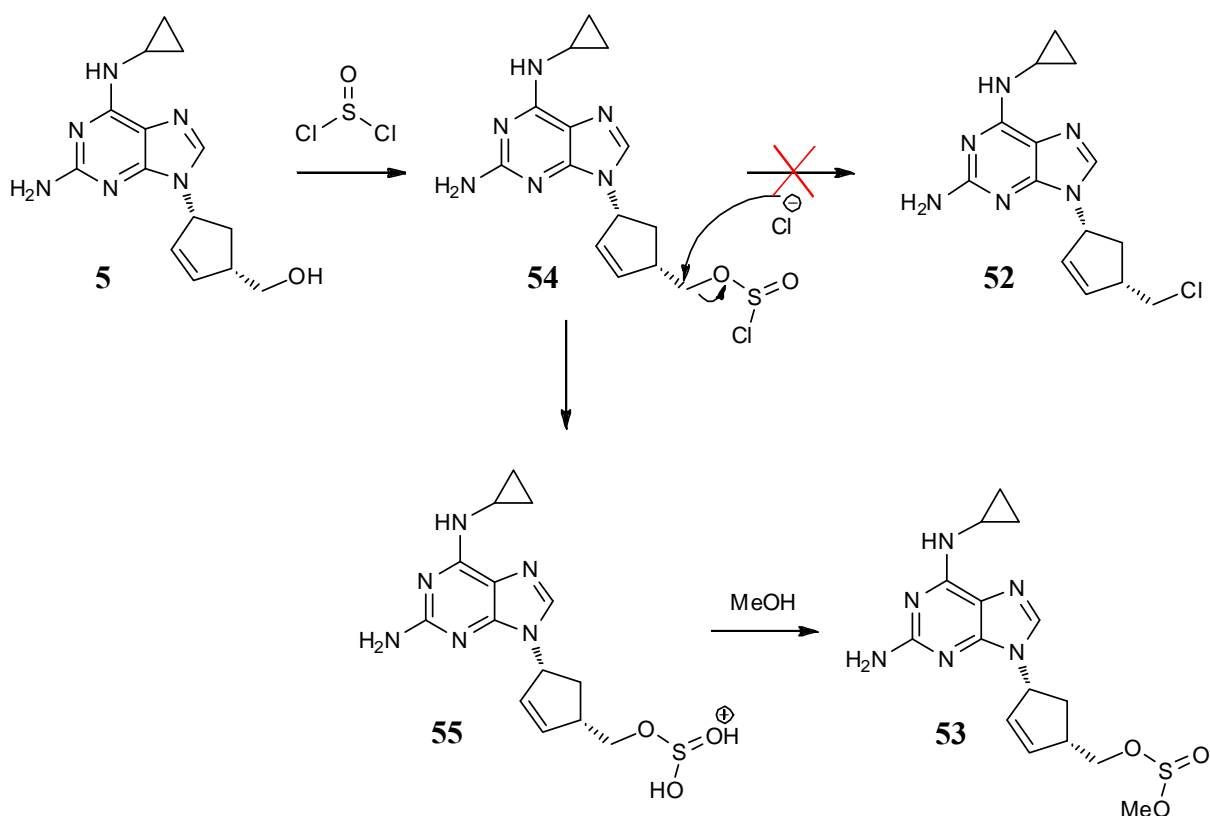
Assim decidiu-se seguir como estratégia a transformação do grupo hidroxilo num bom grupo de saída, por mesilação. Nesta reacção, que envolveu a adição de 1,4 eq de cloreto de mesilo e de uma quantidade equimolar de trietilamina a uma solução de abacavir em diclorometano seco, obteve-se o composto [(1*S*,4*R*)-4-(2'-amino-6-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il) metil metanossulfonato (**51**), por purificação em c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1)], com um rendimento de 42%. A caracterização estrutural do composto teve como base a análise dos espectros de RMN (¹H-RMN, ¹³C-RMN e bidimensionais) e as semelhanças com os desvios químicos obtidos na caracterização estrutural do abacavir, uma vez que a única diferença entre estas duas moléculas é a substituição do grupo OH pelo grupo OMs. A presença do grupo OMs foi evidenciada, no espectro de ¹H-RMN pela existência do singuleto a 2,95 ppm, correspondente aos prótons do grupo metilo, que apresenta correlação, no espectro de HSQC com o sinal a 37,4 ppm, característico de um carbono primário ligado a um átomo de enxofre. É ainda notória a alteração nos desvios químicos correspondentes aos prótons na posição 1'' que se encontram a campo mais baixo (multiplete entre 4,26 ppm e 4,23 ppm), quando comparados com os desvios químicos observados no espectro de ¹H-RMN do abacavir (H_{1''b} a 3,79 ppm e H_{1''a} a 3,90 ppm), o que se explica devido ao carácter electrotractor do grupo OMs. A atribuição dos

restantes sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foi feita analogamente ao descrito na caracterização estrutural do abacavir.

A uma solução deste composto isolado, em acetonitrilo, adicionou-se o valinato de etilo no mesmo solvente. No entanto, não se observou por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1)] a formação de qualquer produto, mesmo após o aquecimento da mistura a 40°C .

Prosseguiu-se com a preparação de outro derivado do abacavir por substituição do grupo OH por um átomo de cloro, usualmente adequado como grupo de saída em reacções $\text{S}_{\text{N}}2$. Na reacção para a preparação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}clorometano (**52**) adicionaram-se 5,8 eq. de cloreto de tionilo a uma solução de abacavir em diclorometano seco. O produto isolado por c.c. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,05)], foi analisado por RMN concluindo-se que não se obteve o produto pretendido. Embora os espectros deste composto e do abacavir tenham sido adquiridos em solventes diferentes, pela análise do espectro de ^1H -RMN observaram-se os sinais característicos do abacavir e ainda a presença dum singuleto a 3,61 ppm compatível com 3 prótons de um grupo metóxilo. Por outro lado, o facto do carbono correspondente à posição 1'' ter um valor de 65,6 ppm indicava que continuava ligado a um átomo de oxigénio. No entanto a análise por LC-MS do produto obtido foi fundamental para a atribuição da estrutura, uma vez que o espectro de massa apresenta um pico a m/z 365 correspondente à molécula protonada do composto {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}metil metanossulfato (**53**), que foi obtido com um rendimento de 20%.

O mecanismo de formação do composto halogenado a partir de um álcool primário por reacção com o cloreto de tionilo, envolve num primeiro passo o ataque do álcool ao cloreto de tionilo resultando na formação do intermediário **54** (Esquema 18), com a saída do ião Cl^- . Num segundo passo por um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$, ocorre o ataque do ião Cl^- ao carbono na posição 1'' do intermediário formando-se o composto **52** (Esquema 18). O facto de não se ter obtido o produto halogenado pretendido, só se explica pela impossibilidade de ocorrência de uma reacção por um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ no carbono 1'' do abacavir, possivelmente devido ao impedimento estereoquímico. A razão para a introdução do grupo metoxilo pode dever-se ao processo de purificação da mistura reaccional que envolveu c.c. com uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,05) como eluente, (Esquema 18). Sendo a sílica ácida poderá ter catalisado a reacção de adição de metanol ao intermediário **55** formando o composto obtido (**53**).



Esquema 18 - Mecanismo proposto para a formação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}metil metanossulfato (53**).**

Este resultado torna-se muito importante na medida em que se não houve a substituição do átomo de cloro então seria esperado o insucesso na reacção em que se tentou a formação do aducto através de reacções $\text{S}_{\text{N}}2$, com o derivado O- mesilado do abacavir. Mais uma vez este facto foi comprovado quando se efectuou a incubação do composto **53** (que possui um excelente grupo de saída) com o valinato de etilo não se tendo observado a formação de qualquer produto.

2.5 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica de fígado de rato

De modo a reproduzirem-se as condições fisiológicas, realizaram-se ensaios com a incubação do abacavir e a fracção citosólica do fígado de rato, com base num estudo *in vitro* realizado por Walsh *et al* ^[27] onde se comprovou indirectamente a formação do metabolito aldeídico, em incubações do abacavir com uma fracção citosólica de fígado humano.

Para os ensaios de incubação procedeu-se da seguinte forma: a uma solução aquosa de abacavir (3 $\mu\text{g/mL}$) adicionou-se uma solução de citosol (1 mg/mL) em tampão pirofosfato de sódio, $\text{pH}=8,8$, 50 mM e uma solução de NAD^+ 7,5 mM. Retiraram-se aliquotas após 2 horas

e 20 horas de incubação a 37° C, que após filtração por crivagem molecular foram analisadas por LC-MS por comparação com os padrões de aldeídos preparados através da oxidação do abacavir pelo método de Swern. Os cromatogramas obtidos apresentavam apenas um sinal com tr e espectro de massa idêntico ao sinal do aldeído conjugado (**26**) padrão. No entanto devido à facilidade de isomerização do aldeído não conjugado em solução não foi possível a sua comparação com este sinal obtido, não se podendo assim concluir qual dos aldeídos se formou. Verificou-se ainda um aumento da intensidade do sinal, correspondente ao aldeído, com o aumento do tempo de incubação (20 horas).

A análise do branco preparado de forma idêntica, com a excepção de que não se adicionou o cofactor NAD^+ , revelou também a existência do sinal correspondente ao aldeído formado. No entanto, este não poderá ser considerado um “verdadeiro branco”, pois nestas condições poderá ainda ocorrer a bioactivação do abacavir por reacção estequiométrica da enzima álcool desidrogenase, presente na fracção citosólica, com o abacavir para formar o metabolito aldeídico. Esta é uma possível explicação para o facto de, nos ensaios de branco, se ter observado sinal cromatográfico correspondente a este produto. Um verdadeiro ensaio de branco seria então preparado com a desnaturação prévia da enzima responsável pela bioactivação do abacavir. Estes testes estão a ser realizados, no entanto até à data não foi possível obter os resultados.

Analogamente, realizaram-se ensaios em que no final da incubação (após 2 ou 20 h) foi adicionado valinato de etilo (4 eq.) em tampão pirofosfato de sódio, pH=8,8, 50 mM. Após 30 minutos de incubação a 37° C adicionou-se o NaBH_3CN (0,1 mg), filtrou-se através de crivagem molecular e evaporou-se o solvente por destilação a pressão reduzida. O resíduo obtido foi posteriormente tratado com PTIC em meio básico (condições de degradação de Edman). A fase orgânica resultante da extracção com acetato de etilo foi analisada por LC-MS revelando a presença de um sinal intenso, cujo tempo de retenção e espectro de massa coincidia com o aducto de Edman (**50**), previamente preparado por reacção do valinato de etilo com os aldeídos derivados do abacavir e completamente caracterizado por RMN e MS. Apesar de não se saber qual dos aldeídos se formou na incubação do abacavir com a fracção citosólica, o aparecimento de apenas um sinal no cromatograma prova que apenas o aducto 50, proveniente da reacção do nucleófilo com o aldeído α,β -insaturado **26** se forma nestas condições. Este resultado, vem de encontro com o que já tinha sido observado no ensaio de incubação do aldeído não conjugado (**25b**) previamente isolado com o valinato de etilo. No entanto como o ensaio de “branco” foi também preparado sem desnaturação prévia das proteínas citosólicas foi também observável a formação do aducto **50** nestes ensaios. Ter-se-á também que efectuar um verdadeiro ensaio de branco para que se possa validar os resultados

obtidos nestas incubações, que se se vierem a comprovar indicam que efectivamente a enzima álcool desidrogenase catalisa a formação de um derivado aldeídico a partir do abacavir. Ao contrário do que foi defendido por Walsh *et al* ^[27], mesmo que o aldeído não conjugado se forme in vivo este rapidamente isomeriza para o produto termodinamicamente mais estável, o aldeído conjugado, e será este o metabolito reactivo responsável pela formação de aductos com bionucleófilos. Estes ensaios de incubação indicam ainda que o aducto com a valina poderá formar-se em condições fisiológicas.

2.6 - Conclusões

A partir da oxidação do abacavir pelo método de Swern preparou-se o aldeído não conjugado (**25b**), possível intermediário do metabolito maioritário do abacavir (1''-carboxilato). Preparou-se ainda pelo mesmo método, em diferentes condições experimentais, o aldeído α,β -insaturado **26**, que se pensa estar envolvido no processo de metabolização do abacavir, sendo formado *in vivo* por um processo de isomerização do aldeído não conjugado.

A possibilidade do aldeído α,β -insaturado **26** formar aductos covalentes com bionucleófilos (como o valinato de etilo e a lisina), por um processo que envolve a formação inicial de uma base de Schiff, foi comprovada na análise por LC-MS das misturas reaccionais obtidas após incubação com estes amino ácidos e após subsequente estabilização da imina formada por redução com NaBH_3CN . Efectivamente nos ensaios de modificação deste aldeído com valinato de etilo em que se procedeu à derivatização do aducto obtido com fenilisotiocianato em meio básico foi possível isolar a hidantoína formada (aducto de Edman), que foi caracterizada totalmente por RMN e MS. Este aducto foi subsequentemente utilizado como padrão para confirmar a possibilidade de formação de aductos com as valinas terminais da Hb em ensaios de incubação *in vitro* do aldeído conjugado com a Hb (seguida de estabilização por redução e degradação de Edman). A possibilidade de formação de um aducto de Edman em condições fisiológicas foi também comprovada, por LC-MS por comparação com o padrão preparado, nos ensaios de incubação do abacavir na fracção citosólica do fígado de rato, seguida por adição com valinato de etilo, redução e degradação de Edman.

Embora a possibilidade de formação do aldeído não conjugado seja plausível de ocorrer *in vivo*, nestes ensaios apenas se obteve um aducto com a valina, cujo tempo de retenção e espectro de massa coincidia com o padrão preparado. Este resultado mostra que mesmo que o aldeído não conjugado se forme *in vivo* este isomeriza rapidamente ao produto termodinamicamente mais estável, o aldeído conjugado. Será este o intermediário electrófilo responsável pela reacção com bionucleófilos levando à formação de aductos covalentes que poderão estar na génese das reacções tóxicas associadas ao abacavir. Este resultado foi ainda comprovado em ensaios de incubação do aldeído não conjugado (previamente sintetizado por oxidação de Swern do abacavir) com o valinato de etilo seguida por redução e degradação de Edman que levou ao isolamento do aducto **50**.

A incubação da HSA com o aldeído conjugado (com e sem estabilização por redução) seguida de hidrólise aos aminoácidos não possibilitou a identificação por LC-MS de qualquer

aducto covalente com a lisina. Este resultado poderá dever-se à não ocorrência de reacção de formação aducto entre este aldeído e as lisinas da HSA que estão expostas ao solvente ou a uma deficiente hidrólise da proteína.

Quanto ao mecanismo de formação dos aductos pode-se concluir que a adição dos nucleófilos (valinato de etilo e lisina) ao aldeído α,β -insaturado ocorre unicamente por adição directa ao carbonilo, uma vez que não foram detectados aductos formados pela adição de Michael. Mesmo na presença de nucleófilos moles, como a *N*-acetil cisteína e a glutathione não foi possível obter por LC-MS evidência de formação de aductos deste tipo.

Explorou-se também neste trabalho uma via sintética, não biomimética, para a preparação de padrões de aductos covalentes derivados do abacavir. Para tal, o grupo hidroxilo do abacavir foi interconvertido num bom grupo de saída de modo a possibilitar a formação de aducto por um mecanismo do tipo S_N2 . No entanto, os resultados obtidos nesta via comprovaram que o carbono 1'' do abacavir não reage por este mecanismo, muito provavelmente devido a impedimento estereoquímico.

Os resultados obtidos nestes ensaios parecem comprovar a hipótese inicial deste trabalho. A oxidação do abacavir ao metabolito 1''-carboxilato envolve a formação dum intermediário aldeídico (maioritariamente o aldeído conjugado), que tem a capacidade de reagir com bionucleófilos formando aductos covalentes. A possibilidade de formação de aductos covalentes com as valinas terminais da Hb, aliada à facilidade de hidrólise selectiva destes aductos (por degradação de Edman) e à existência de padrões sintéticos deste aducto são factores importantes para a sua possível utilização como biomarcador da toxicidade associada ao abacavir.

Capítulo 3 - Procedimiento Experimental

3.1 - Preâmbulo

3.1.1 - Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza p.a. e foram fornecidos pela Aldrich, Fluka e Sigma. Foram utilizados (L)- α -aminoácidos em todos os ensaios. Os solventes usados foram sempre que necessário purificados e secos segundo métodos padronizados.^[57]

O tampão Tris [tris(hidroximetil)aminometano] pH 7,44, 50 mM foi preparado com 605 mg de Tris em 100 mL de água destilada e utilizou-se uma solução de HCl 1 M para acertar o pH. O tampão fosfato pH 7,4, 50 mM foi preparado a partir de 2,2 g de Na_2HPO_4 e 3,4 g de KH_2PO_4 para 250 mL de água destilada. O tampão fosfato pH 7,4, 0,1 M foi preparado a partir de 44 g de Na_2HPO_4 e 68 g de KH_2PO_4 para 250 mL de água destilada. O tampão pirofosfato de sódio pH 8,8, 50 mM foi preparado a partir de 559 mg de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e utilizou-se uma solução de H_3PO_4 para acertar o pH.

A solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP) foi preparada do seguinte modo: preparou-se uma solução de DNP (600mg) numa mistura de água destilada (4 mL) e etanol 96% (14 mL); a solução foi arrefecida num banho de gelo até atingir 10°C e adicionou-se, lentamente e com agitação constante, ácido sulfúrico concentrado (3 mL) de modo a que a temperatura não excedesse os 20°C. De seguida a mistura foi aquecida a 40° C, temperatura à qual houve dissolução total do DNP.^[58]

Os ensaios de incubação em citosol foram efectuados na UNL-FCM, tendo o procedimento de isolamento do citosol do fígado de rato sido efectuado pela Dra. Sofia Azeredo Pereira. Este procedimento consistiu inicialmente na extracção do fígado, seguido de lavagem e pesagem. Cortaram-se pequenas porções, adicionou-se o meio de isolamento e homogeneizou-se. Por fim o citosol é obtido a partir do método de centrifugação diferencial: centrifugou-se durante 20 minutos a 10000 g e 4° C; descartou-se o precipitado e o sobrenadante foi novamente centrifugado durante 60 minutos a 100000 g e 4° C. O sobrenadante obtido é o citosol que foi armazenado a -80° C.

Uma amostra do abacavir foi disponibilizada pelo programa “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program” (abacavir, Cat 4680).

3.1.2 - Cromatografia em camada fina e cromatografia em coluna

Para a realização de cromatografia em camada fina (c.c.f.) foram utilizadas placas de Sílica Gel 60 F254 da Merck com espessura 0,2 mm. As placas utilizadas em cromatografia em camada fina preparativa (c.c.f.p.) foram Sílica Gel 60 F254 da Merck com uma espessura de 0,5 mm. As placas foram observadas por luz ultra-violeta a um comprimento de onda de 254 nm e/ou por pulverização com um revelador de DNP. Para cromatografia em coluna (c.c.) utilizou-se Sílica Gel 60H da Merck com grânulos de 55 µm. Em todos os casos o eluente é referido, indicando-se a proporção volumétrica dos componentes utilizados nos eluentes mistos.

A celite 545 Coarse da Fluka foi usada para dispersar os produtos que incluem este passo na descrição da sua purificação.

3.1.3 - Cromatografia líquida de alta resolução

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foi efectuada num sistema Ultimate 3000 da Dionex equipado com bomba quaternária (LPG-3400A), um detector de fotodíodos (DAD, Ultimate 3000) e com um sistema de injeção automática (Rheodyne Model 8125). O HPLC analítico foi efectuado numa coluna de fase reversa Luna C18(2) (250 x 4,6 mm, 5 µm) da Phenomenex, com um fluxo de 1mL/min e o HPLC preparativo foi efectuado numa coluna Luna C18 (2) (250 mm x 10 mm, 5 µm) da Phenomenex com um fluxo de a 3 mL/min. O programa de gradientes utilizado será especificado em cada caso. A absorção no UV foi monitorizada a 250 nm.

3.1.4 - Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (^1H -RMN) foram adquiridos num espectrómetro de modelo Avance Plus III 300, 400, 500, operando a 300, 400 e 500 MHz, respectivamente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 (^{13}C -RMN) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400 e Bruker Avance III Plus 500, operando a 100,6 MHz e 120,8 MHz, respectivamente. Utilizou-se o tetrametilsilano como padrão interno.

Os desvios químicos são expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Em cada situação será indicado o solvente usado bem como os dados obtidos que serão apresentados da seguinte forma: **Núcleo estudado** (solvente):

desvio químico (δ , ppm) [intensidade relativa (nH, como número de prótons), multiplicidade (s -singuleto; d - duplete; t - triplete; dd - duplo de duplete; m - multiplete), constante de acoplamento (J , Hz) e atribuição na molécula].

A elucidação estrutural de todos os compostos sintetizados foi efectuada com base na análise dos resultados obtidos nas experiências bidimensionais. As experiências de *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC), *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC), *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (COSY) e *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY) foram efectuadas usando os programas de pulso *standard* da Bruker.

3.1.5 - Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro Jasco FT/IR-4100 (tipo A). As amostras foram incorporadas em KBr ou em células de NaCl. Os espectros foram obtidos em modo de transmitância entre 4000 e 600 cm^{-1} . São apresentadas apenas as frequências correspondentes aos sinais mais intensos ou às bandas características. Os resultados obtidos encontram-se apresentados pela seguinte ordem: estado físico da amostra – KBr (em pastilha de brometo de potássio) ou filme (em células de cloreto de sódio); frequência máxima de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}), atribuição a um grupo de átomos na molécula.

3.1.6 - Espectrometria de massa

O aparelho de espectrometria de massa usado foi o espectrómetro de massa Varian 500-MS LC Ion Trap, com ionização por *electrospray* (ESI). Para a análise de LC-MS foi usada uma coluna Luna C18 100A (50 mm x 2,0 mm; da Phenomenex) de 3 μm . A fase móvel foi passada com um fluxo de 0,2 mL/min, usando um gradiente de 30 min de 5-70% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1% (v/v) seguido de 2 min até 100% de acetonitrilo, ao fim de 8 min retoma as condições iniciais em 5 min seguida de rotina de 7 min para equilibrar a coluna. Para a análise dos aductos de Edman foi utilizado o seguinte programa de gradientes: 15 min. de 0 a 100% de acetonitrilo seguido de 2 min. a 100% de acetonitrilo e de um gradiente linear de 8 min. até 0% de acetonitrilo, que se manteve durante 10 min..Os resultados obtidos serão referidos pela ordem seguinte: razão massa/carga (m/z), atribuição do ião ou fragmento molecular, intensidade do pico relativa à do pico base (%).

3.2 - Extração do [(1*S*,4*R*)-4-(2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metanol (abacavir,) de comprimidos *Ziagen*®

Pulverizaram-se 4 comprimidos *Ziagen*® (cada um contém 300 mg de abacavir sob a forma de sulfato). Adicionou-se água destilada (300 mL) e a dispersão obtida foi filtrada e depois extraída com CH₂Cl₂ (3 x 200 mL). À solução aquosa adicionou-se KOH 1N até se atingir pH igual a 8, extraiu-se com CH₂Cl₂ (4 x 200 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de magnésio anidro, e filtradas. Após destilação do solvente a pressão reduzida obteve-se um sólido branco (**5**), com rendimento de 100% de extração (1,2 g).

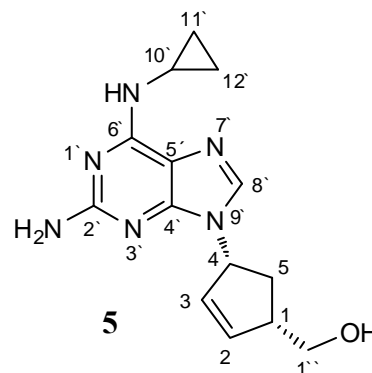
¹H-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 7,46 (1H, s, H_{8'}), 6,11- 6,09 (1H, m, H₂), 5,85 (1H, s, N₆-H, troca D₂O), 5,76-5,74 (1H, m, H₃), 5,43-5,39 (1H, m, H₄), 4,82 (2H, s, N₂-H₂, troca D₂O), 3,90 (1H, dd, *J* 3,8Hz e *J* 10,8 Hz, H_{1'a}), 3,79 (1H, dd, *J* 3,0 Hz *J* 10,8 Hz, H_{1'b}), 3,13-3,10 (1H, m, H₁), 2,99-2,94 (1H, m, H_{10'}), 2,81-2,74 (1H, m, H_{5a}), 2,21-2,16 (1H, m, H_{5b}), 2,12 (1H, s largo, OH, troca D₂O), 0,85-0,81 (2H, m, H_{11a'} e H_{12a'}), 0,60-0,57 (2H, m, H_{11b'} e H_{12b'}).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 159,4 (C_{2'} ou C_{6'}), 156,6 (C_{2'} ou C_{6'}), 150,2 (C_{4'}), 138,3 (C₂), 137,2 (C_{8'}), 130,7 (C₃), 115,8 (C_{5'}), 65,4 (C_{1'}), 61,9 (C₄), 47,9 (C₁), 32,4 (C₅), 23,8 (C_{10'}), 7,6 (C_{11'} e C_{12'}).

IV (KBr) ν_{máx.}: 3324 (O-H)

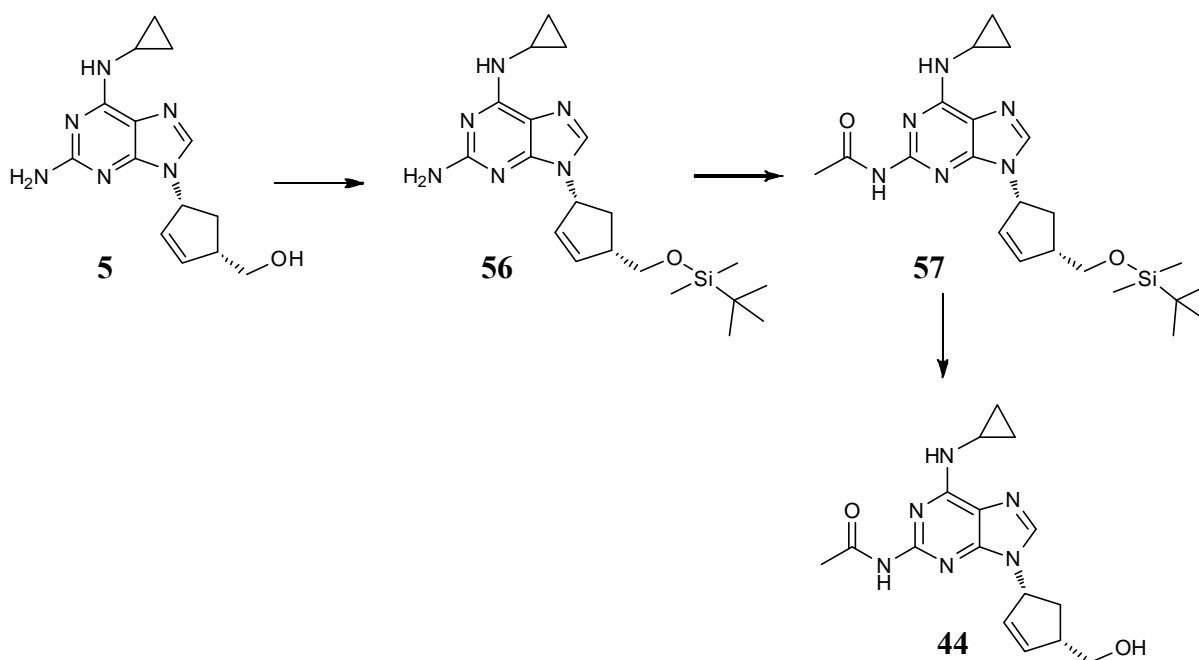
EM (ESI) m/z: 287 [MH]⁺.

Os dados espectroscópicos estão de acordo com os dados da literatura. [39], [40]



3.3 - Preparação de compostos derivados do abacavir

3.3.1 - Síntese do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il}metanol (*N*-acetil-abacavir, 44)

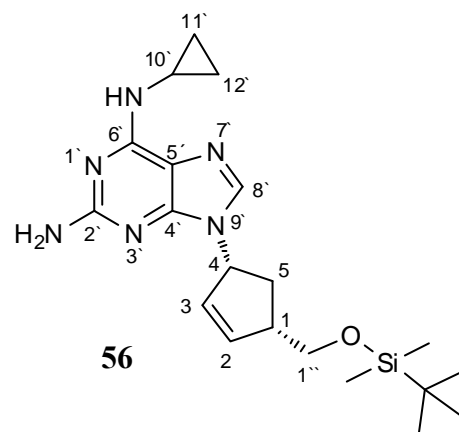


3.3.1.1 - Preparação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il}metoxi(terc-butildimetilsilano) (56)

A uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 500 mg, 1,75 mmol) em piridina anidra (8 mL), sob atmosfera de azoto, adicionou-se cloreto de *terc*-butil-dimetilsilano (2,5 eq., 658 mg, 4,37 mmol). Colocou-se a mistura reaccional num banho de óleo a 60° C e deixou-se sob agitação magnética durante 3 horas. Decorrido este tempo adicionou-se tolueno e co-evaporou-se a piridina a pressão reduzida. Obteve-se um sólido branco que foi posteriormente re-dissolvido em diclorometano (15 mL) e lavou-se com água destilada (10 mL). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente destilado a pressão reduzida. Obteve-se o composto **56** sob a forma de óleo amarelo com um rendimento de 72% (504 mg).

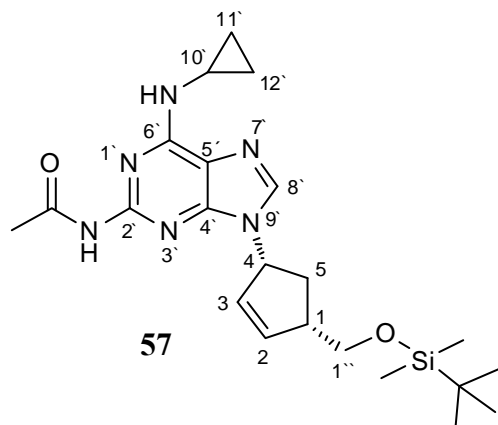
¹H-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 7,55 (1H, s, H₈), 6,13- 6,10 (1H, m, H₂), 5,88 (1H, s, N₆-H), 5,83-5,81 (1H, m, H₃), 5,57-5,52 (1H, m, H₄), 4,87 (2H, s, N₂-H₂), 3,70 (1H, dd, J=

5,4 e J=9,9, H_{1a''}), 3,61 (1H, dd, J= 5,8 e J=9,9, H_{1b''}), 3,02-2,94 (2H, m, H₁ e H_{10'}), 2,78-2,70 (1H, m, H_{5a}), 2,65-2,58 (1H, m, H_{5b}), 0,86-0,84 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}), 0,64-0,60 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}), 0,88 (9H, s, *t*-Bu), 0,04 (6H, s, Si-CH₃).



3.3.1.2 - Preparação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il}metoxi(terc-butildimetilsilano) (57)

A uma solução de **56** (1,0 eq., 416 mg, 1,04 mmol) em piridina anidra (8 mL) adicionou-se cloreto de acetilo (4,5 eq., 332 μ L, 4,67 mmol). A mistura ficou sob agitação e no decorrer deste período de tempo controlou-se a reacção por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,05), sílica]. Ao fim de 5 horas de reacção adicionou-se uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (80 mL) e extraiu-se com diclorometano (5 x 250 mL). Reuniram-se as fases orgânicas, secou-se sobre sulfato de magnésio anidro e filtrou-se. Concentrou-se a mistura bruta e adicionou-se tolueno de modo a co-evaporar a piridina sob pressão reduzida. Obteve-se um resíduo amarelo acastanhado (481 mg).

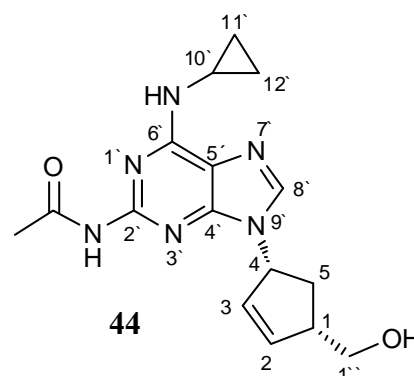


3.3.1.3 - Preparação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il}metanol (44)

À mistura obtida em 3.3.1.2 (240 mg) em THF (6 mL) adicionou-se uma solução de fluoreto de tetrabutilamónio (TBAF) em THF, 1M (500 μ L). Deixou-se a mistura reaccional sob agitação e atmosfera de azoto durante 3 horas, tendo-se controlado a reacção por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica]. Destilou-se o solvente a pressão reduzida, adicionou-se água destilada (30 mL) e extraiu-se com diclorometano (5 x 50 mL). Secou-se a fase orgânica resultante com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. A mistura foi dispersada em celite e purificada por c.c. [gradiente, CH₂Cl₂/MeOH (1:0,05); (1:0,1), sílica], tendo-se isolado o produto pretendido com um rendimento de 48%.

¹H-RMN (Acetona-d₆) δ(ppm):): 7,88 (1H, s, H_{8'}), 7,15 (1H, s, CONH), 6,19- 6,17 (1H, m, H₂), 5,95-5,93 (1H, m, H₃), 5,63-5,58 (1H, m, H₄), 3,67-2,58 (2H, m, H_{11'}), 3,04-2,99 (1H, m, H₁), 2,78-2,71 (1H, m, H_{5a}), 2,55 (3H, s, CH₃), 1,84-1,74 (1H, , H_{5b}), 2,09-2,04 (parcialmente encoberto pelo sinal do solvente, H_{10'}), 0,82-0,78 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}), 0,72-0,67 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}).

¹³C-RMN (Acetona-d₆) δ(ppm): 172,6 (C=O), 168,8 (C_{2'}), 157,8 (C_{6'}), 154,8 (C_{4'}), 139,9 (C₂), 139,6 (C_{8'}), 131,5 (C₃), 118,3 (C_{5'}), 66,2 (C_{1'}), 61,1 (C₄), 49,7 (C₁), 35,9 (C₅), 26,3 (CH₃), encoberto pelo sinal do solvente (C_{10'}), 7,9 (C_{11'} e C_{12'}).



EM (ESI) m/z: 329 [MH]⁺, 351[M+Na].

3.3.2 - Reacções de formulação do abacavir

3.3.2.1 - Reacção com clorocromato de piridínio (PCC, 30) e clorocromato de piridínio em suporte polimérico (PVPCC)

Método geral I

A uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 50 mg, 0,18 mmol), em diclorometano (10 mL), adicionou-se uma quantidade variável de PCC (Tabela 4). A mistura foi deixada sob agitação magnética durante um período de tempo variável, à temperatura ambiente e foi controlada c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica].

Tabela 4 - Condições experimentais e tratamento das misturas reaccionais obtidas nos ensaios entre o abacavir (5**) e o PCC (**30**).**

Ensaio	PCC (eq.)	Adição de sílica	Adição de alumina	Tempo (horas)
1 ^{a, c, d}	1,1+1,1	✓		5,5
2 ^{c, d}	2,0		✓	24,0
3 ^{b, e}	2,0+0,5	-		2,5
4 ^d	2,0	-		0,7

^a A reacção teve início com 1,1 eq. de PCC e passado 4,5 horas adicionou-se mais 1,1 eq. do reagente.

^b A reacção teve início com 2,0 eq. de PCC e passado 1 hora adicionou-se mais 0,5 eq. deste reagente.

^c No fim da reacção adicionou-se éter dietílico (10 mL) e filtrou-se a mistura reaccional com diclorometano/ metanol (1:0,05).

^d Analisou-se a mistura bruta por ¹H-RMN.

^e A mistura reaccional foi purificada por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica] e posteriormente analisada por ¹H-RMN.

Método geral II

A uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 200 mg 0,70 mmol), num solvente seco, adicionou-se PVPCC (4,0 eq., 798 mg, 2,80 mmol). A mistura reaccional foi deixada sob atmosfera de azoto e agitação, a refluxo, durante período de tempo variável (Tabela 5) tendo sido controlada por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica]. Filtrou-se a mistura resultante sobre celite, em vácuo e o solvente destilado a pressão reduzida.

Tabela 5 - Condições experimentais e tratamento das misturas reacionais obtidas nos ensaios entre o abacavir (5**) e o PVPCC.**

Ensaio	PVPCC (eq.)	Solvente	Tempo(dias)
1	1,1	diclorometano	1
2 ^{a, b}	6,0	<i>p</i> -xileno	5
3 ^c	4,0	<i>p</i> -xileno	5

^a A reacção teve início com 2,0 eq. de PVPCC e no dia seguinte adicionaram-se mais 4,0 eq. deste reagente.

^b A mistura reaccional foi purificada por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] e posteriormente analisada por ^1H -RMN.

^c Analisou-se a mistura bruta por ^1H -RMN e purificou-se uma fracção por HPLC semi-preparativo (gradiente linear de 30 min. de 5 - 70% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 2 min de 70 a 100% de acetonitrilo seguido de 2 min. de 100% de acetonitrilo).

3.3.2.2 – Reacção com complexo de trióxido de enxofre e piridina ($\text{Py}.\text{SO}_3$, **32**)

Método I

A uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 200 mg 0,70 mmol) e Et_3N (3,0 eq., 290 μL , 2,10 mmol), em diclorometano (8 mL) e a 0°C, adicionou-se uma solução do complexo $\text{Py}.\text{SO}_3$ (3,0 eq., 333 mg, 2,10 mmol) em DMSO (42,0 eq., 2,10 mL, 29,40 mmol). A mistura ficou sob agitação, durante 45 minutos. No final da reacção, adicionou-se água destilada gelada (14 mL) e extraiu-se com CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). Combinaram-se as fases orgânicas. Secou-se com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e o solvente destilado a pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] e posteriormente analisou-se a fracção purificada por ^1H -RMN.

Método II

Preparou-se uma solução do complexo $\text{Py}.\text{SO}_3$ (3,0 eq., 84 mg, 0,52 mmol) em DMSO (42,0 eq., 52,0 mL, 0,73 mmol). Após 15 minutos sob agitação e em banho de gelo

(14°C) esta mistura foi adicionada a uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 50 mg, 0,17 mmol) e Et₃N (3,0 eq., 73 µL, 0,52 mmol), em diclorometano (5 mL) e a -13°C. Após a adição deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, ficando sob agitação durante 2 horas. No final da reacção, adicionou-se água destilada gelada (8 mL) e extraiu-se com CH₂Cl₂ (4 x 5 mL). Combinaram-se as fases orgânicas. Secou-se com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e o solvente destilado a pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica] e posteriormente analisou-se a fracção purificada por ¹H-RMN.

3.3.2.3 – Reacção com perrutenato de tetrapropilamónio (TPAP, 39)

Método geral

Num *schlenk* contendo peneiros moleculares (4A) e sob atmosfera de azoto, adicionou-se abacavir (**5**) (1,0 eq., 50 mg, 0,17 mmol) e NMO (1,5 eq., 31 mg, 0,26 mmol). Adicionou-se um solvente apropriado (Tabela 6) e deixou-se a mistura sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Decorrido este tempo adicionou-se uma quantidade variável do catalisador TPAP (0,05 eq., 3 mg, 8,5 µmol ou 0,08 eq., 5 mg, 13,6 µmol). A mistura reaccional permaneceu sob agitação e à temperatura ambiente durante 24 horas, tendo sido controlada por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica]. Concentrou-se a mistura e purificou-se por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica, revelada por pulverização com solução de DNP. Isolaram-se os compostos obtidos nos 3 ensaios realizados e foram analisados por ¹H NMR e EM (ESI).

Tabela 6 - Condições experimentais dos ensaios entre o abacavir (5**) e o TPAP (**39**).**

Ensaio	Solvente	TPAP (eq.)
1	Diclorometano seco	0,05
2	Acetonitrilo	0,05
3	Diclorometano seco	0,08

3.3.2.4 - Reacção com periodinano de Dess-Martin (DMP)

Método geral

Num balão contendo abacavir (**5**) (1,0 eq., 50 mg, 0,17 mmol) em THF (4 mL) e em banho de água fria, adicionou-se DMP (1,5 eq., 111 mg, 0,26 mmol). Adicionou-se uma base apropriada (Tabela 7) à mistura reaccional e esta foi deixada sob agitação e atmosfera de azoto e à temperatura ambiente. Controlou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,05), sílica, revelada por pulverização com solução de DNP] durante um período de tempo máximo de 24 horas. Adicionou-se éter dietílico (3 mL) e filtrou-se sobre celite. Destilou-se o solvente sob pressão reduzida e analisou-se por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 25% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1% seguido de gradiente linear de 10 min. até 0% de acetonitrilo).

Tabela 7 - Condições experimentais dos ensaios entre o abacavir (**5**) e o DMP (**37**).

Ensaio	Base	Base (eq.)
1	Piridina	2,0
2	Hidrogenocarbonato de sódio	10,0

3.3.2.5 - Reacção com dióxido de manganês (IV) (MnO_2 , **42**)

A uma suspensão de abacavir (**5**) (1,0 eq., 50 mg 0,17 mmol) em diclorometano seco (6 mL) adicionou-se MnO_2 (20,0 eq., 304 mg, 3,49 mmol). A mistura ficou sob atmosfera de azoto e agitação vigorosa. Controlou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica, revelada por pulverização com solução de DNP]. Adicionou-se diclorometano e filtrou-se sobre celite, lavando-se bem com o solvente. Evaporou-se este sob pressão reduzida e analisou-se a mistura reaccional por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 5 min até 100% de acetonitrilo).

3.3.2.6 - Reacção de Swern

3.3.2.6.1 - Ensaios para a optimização das condições experimentais

Método geral

Num balão de duas tubuladuras, com um solvente seco apropriado e sob atmosfera de azoto adicionou-se uma quantidade variável de $(\text{COCl})_2$, **31** (Tabela 7). Colocou-se o balão

num banho a -78°C e adicionou-se DMSO seco. A mistura foi deixada em agitação magnética durante um período de tempo variável (5 ou 30 minutos) formando-se uma solução branca. A esta solução foi adicionada, com uma seringa, uma suspensão de abacavir (**5**) em solvente seco. Deixou-se a mistura reaccional sob agitação durante 1 hora, mantendo a temperatura do banho a -78°C . Decorrido este período de tempo adicionou-se uma quantidade variável de Et_3N anidra ou *N,N*-di-isopropiletilamina e aumentou-se a temperatura do banho. Deixou-se a mistura reaccional durante um período de tempo variável em agitação magnética.

O resíduo obtido foi purificado por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica, revelada por pulverização de solução de DNP]. Os compostos obtidos foram analisados por HPLC analítico

(gradiente linear de 20 min. de 0 a 25% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 10 min de 25 a 100% de acetonitrilo) e por ^1H -RMN.

Tabela 8 - Condições experimentais e resultados obtidos nos ensaios da reacção de Swern.

Ensaio	Solvente	(COCl) ₂ (eq.)	DMSO (eq.)	Base (eq.)	Tempo de reacção após adição de base (horas)	Composto obtido e η (%)	
1 ^{a, c, e, g}	THF	1,3	2,6	5,0	1,0	26	18
2 ^{a, c, e, h}	THF	1,3	2,6	5,2	1,0	26	<1
3 ^{a, c, e, h}	THF	2,0	4,0	5,0	1,0	26	<3
4 ^{a, c, e, g}	CH_2Cl_2	2,0	4,0	5,2	1,0	26	<3
5 ^{b, c, f, g}	CH_2Cl_2	2,0	4,0	5,0	5,0	26	<1
6 ^{b, c, e, g}	CH_2Cl_2	2,0	4,0	5,0	1,0	26	<1
7 ^{b, d, g, i}	CH_2Cl_2	2,0	4,0	5,0	1,0	-	0
8 ^{a, d, e, g}	THF	2,0	4,0	5,0	1,0	25b	7
9 ^{a, d, e, g}	THF	1,3	2,6	5,2	1,0	26	<8

^a A reacção entre o (COCl)₂ e o DMSO ficou sob agitação durante 5 ou ^b 30 minutos.

^c Adicionou-se Et_3N ou ^d *N,N*-di-isopropiletilamina como base.

^e Após adição de base aumentou-se a temperatura do banho para 0°C ou ^f retirou-se o banho e deixou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente.

^g No fim da reacção e mantendo a temperatura a que se encontrava, foi adicionada H_2O destilada, extraiu-se com Et_2O , secou-se a fase orgânica resultante com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e destilou-se o solvente sob pressão reduzida.

^h No fim da reacção e mantendo a temperatura a que se encontrava, adicionou-se acetato de etilo à mistura reaccional. Filtrou-se sobre celite em funil de placa porosa, através de vácuo. Lavou-se com acetato de etilo e o solvente destilado sob sob pressão reduzida.

ⁱ Neste ensaio após a adição da base a -78° , deixou-se a mistura reaccional sob agitação durante 10 minutos, tendo-se aumentado de seguida a temperatura do banho para -10°C . Manteve-se esta temperatura até adição de água destilada.

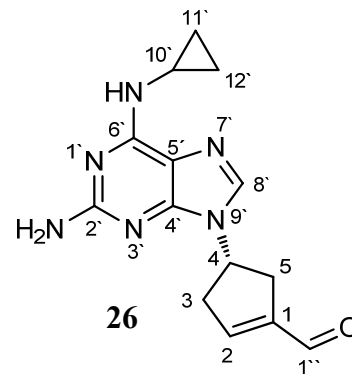
(S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (26)

¹H-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 9,77 (1H, s, H_{1'}), 7,38 (1H, s, H_{8'}), 6,89-6,87 (1H, m, H₂), 5,95 (1H, m, N₆H), 5,16-5,14 (1H, m, H₄), 4,90 (2H, s, N₂H₂), 3,23-3,02 (2H, m, H_{3a} e H_{5a}), 2,97-2,88 (3H, m, H_{3b}, H_{5b} e H_{10'}), 0,77-0,75 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}), 0,52-0,51 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 189,0 (C_{1''}), 160,2 (C_{2'} ou C_{6'}), 156,6 (C_{2'} ou C_{6'}), 151,2 (C_{4'}), 148,8 (C₂), 145,6 (C₁), 135,1 (C_{8'}), 115,7 (C_{5'}), 52,5 (C₄), 42,3 (C₃), 36,1 (C₅), 23,9 (C_{10'}), 7,6 (C_{11'} e C_{12'}).

IV (NaCl) ν_{máx.}: 1603 cm⁻¹ (C=O).

EM (ESI) m/z: 285 [MH]⁺, 191 [MH₂-ciclopent-1-enilcarbaldeído]⁺.

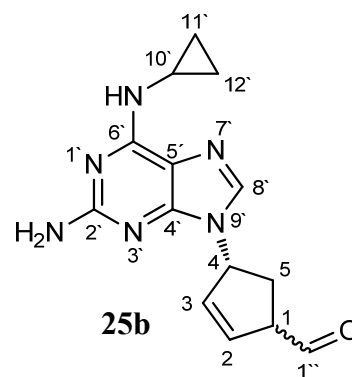


(S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (25b)

¹H-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 9,83(1H, s, H_{1'}), 7,48 (1H, s, H_{8'}), 6,11-6,08 (1H, m, H₃), 5,95 (1H, s, N₆H), 5,79-5,77 (1H, m, H₂), 5,47-5,42 (1H, m, H₄), 4,79 (2H, s, N₂H₂), 3,11-3,07 (1H, m, H₁), 2,98-2,94 (1H, m, H_{10'}), 2,81-2,70 (1H, m, H_{5a}), 2,09-2,00 (1H, m, H_{5b}), 0,85-0,80 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}), 0,62-0,58 (2H, m, H_{11'} e H_{12'}).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ(ppm): 189,0 (C_{1''}), 159,8 (C_{2'} ou C_{6'}), 150,4 (C_{4'}), 115,6 (C_{5'}), 137,9 (C₃), 136,5 (C_{8'}), 130,8 (C₂), 115,6 (C_{5'}), 61,4 (C₄), 47,9 (C₁), 33,1 (C₅), 23,6 (C_{10'}), 7,7 (C_{11'} e C_{12'}).

EM (ESI) m/z: : 285 [MH]⁺, 191 [MH₂-ciclopent-2-enilcarbaldeído]⁺



3.3.2.6.2 - Preparação do (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (26)

A uma solução contendo (COCl)₂ (1,3 eq, 78 μL, 0,91 mmol), em THF seco (3 mL), sob atmosfera de azoto, em banho de -78° C foi adicionado DMSO seco (2,6 eq, 130 μL, 1,82 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação magnética durante 5 minutos, formando-se uma solução branca à qual foi adicionada uma suspensão de abacavir (**5**) (1,0 eq, 200 mg, 0,70 mmol) em THF seco (9 mL). Deixou-se a mistura reaccional sob agitação

durante 1 h, num banho a -78°C . Decorrido este período de tempo adicionou-se Et_3N anidra (5,2 eq, 507 μL , 3,64 mmol) e aumentou-se a temperatura do banho para 0°C . Deixou-se a mistura reaccional durante 1 h em agitação magnética. Foi adicionada H_2O destilada (9 mL), ainda com a mistura em banho de 0°C . Retirou-se o banho e extraiu-se com éter dietílico (10 x 30 mL), secou-se a fase orgânica resultante com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e destilou-se o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c.f.p. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10%, sílica) e o composto **26** foi obtido sob a forma de óleo amarelo, com rendimento de 18% (36 mg).

3.3.2.6.3 - Preparação do (*S*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (25b**)**

A uma solução contendo $(\text{COCl})_2$ (2,0 eq., 60 μL , 0,70 mmol), em THF seco (3 mL), sob atmosfera de azoto, em banho de -78°C foi adicionado DMSO seco (4,0 eq., 100 μL , 1,40 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação magnética durante 5 minutos, formando-se uma solução branca à qual foi adicionada uma suspensão de abacavir (**5**) (1,0 eq., 100 mg, 0,35 mmol) em THF seco (6 mL). Deixou-se a mistura reaccional sob agitação durante 1 h, num banho a -78°C . Decorrido este período de tempo adicionou-se *N,N*-diisopropiletilamina (5,0 eq., 304 μL , 1,75 mmol) e aumentou-se a temperatura do banho para 0°C . Deixou-se a mistura reaccional durante 1 h em agitação magnética. Foi adicionada H_2O destilada (6 mL), ainda com a mistura em banho de 0°C . Retirou-se o banho e extraiu-se com éter dietílico (6 x 25 mL), secou-se a fase orgânica resultante com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e destilou-se o solvente a pressão reduzida.

O resíduo obtido foi dissolvido em THF e purificado por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica, revelada por pulverização com solução de DNP]. Obteve-se o composto **25b** sob a forma de óleo amarelo, com rendimento de 7% (14 mg).

3.3.3 - Reacção de formilação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-acetamida-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9-il]ciclopent-2-en-1-il}metanol (**44**)

3.3.3.1 - Reacção com clorocromato de piridínio (PCC)

Método I

A uma solução de **44** (1,0 eq., 17 mg, 0,052 mmol) adicionou-se o PCC (2,0 eq., 22 mg, 0,10 mmol). A mistura reaccional ficou sob agitação durante 1,5 horas após o que se adicionou mais 1,0 eq. de PCC. Deixou-se a reacção em agitação durante 24 horas, sob controlo por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica]. Filtrou-se em funil de placa porosa, sobre celite e o solvente foi posteriormente destilado a pressão reduzida. Purificou-se a mistura por c.c.f.p. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica] e analisaram-se os produtos obtidos por ¹H-RMN.

Método II

Preparou-se uma solução de **44** (1,0 eq., 20 mg, 0,06 mmol) à qual se adicionou o PCC (2,0 eq., 26 mg, 0,12 mmol). A mistura reaccional ficou sob agitação durante 2,0 horas, sob controlo por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica]. Analisou-se a mistura reaccional por HPLC analítico. (gradiente linear de 30 min. de 5 a 70% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 2 min de 70 a 100% de acetonitrilo e de 15 min. a 100% de acetonitrilo).

3.3.3.2 - Reacção de Swern

Método I

A uma solução contendo (COCl)₂ (2,0 eq., 38 µL, 0,44 mmol) em THF seco (3 mL), sob atmosfera de azoto, em banho de -78° C foi adicionado DMSO seco (4,0 eq., 63 µL, 0,89 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação magnética durante 5 minutos, formando-se uma solução branca à qual foi adicionada uma solução de **44** (1,0 eq., 73 mg, 0,22 mmol) em THF seco, 8 mL). Deixou-se a mistura reaccional sob agitação durante 1 h, num banho a -78° C. Decorrido este período de tempo adicionou-se Et₃N (5,0eq., 155 µL, 1,11 mmol) e aumentou-se a temperatura do banho para 0°C. Deixou-se a mistura reaccional durante 1 hora sob agitação magnética. Adicionou-se acetato de etilo, ainda com a mistura em banho de 0° C, filtrou-se o resultante e destilou-se o solvente sob pressão reduzida. Purificou-se a mistura reaccional por c.c.f.p. [AcOEt, sílica]. Isolaram-se dois compostos que

foram analisados por ^1H -RMN e por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 10 min de 15 a 100% de acetonitrilo).

Método II

A uma solução contendo $(\text{COCl})_2$ (5,0 eq., 84 μL , 0,97 mmol) em THF seco (3 mL), sob atmosfera de azoto, em banho de -78°C foi adicionado DMSO seco (10,0 eq., 140 μL , 1,95 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação magnética durante 5 minutos, formando-se uma solução branca à qual foi adicionada uma solução de **44** (1,0 eq., 64 mg, 0,19 mmol) em THF seco (5 mL). Deixou-se a mistura reaccional sob agitação durante 1 h, num banho a -78°C . Decorrido este período de tempo adicionou-se Et_3N (14,0 eq., 380 μL , 2,73 mmol) e aumentou-se a temperatura do banho para 0°C . Deixou-se a mistura reaccional durante 1 hora sob agitação magnética. Adicionou-se acetato de etilo, ainda com a mistura em banho de 0°C , filtrou-se o resultante e destilou-se o solvente sob pressão reduzida. Analisou-se por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 10 min de 15 a 100% de acetonitrilo).

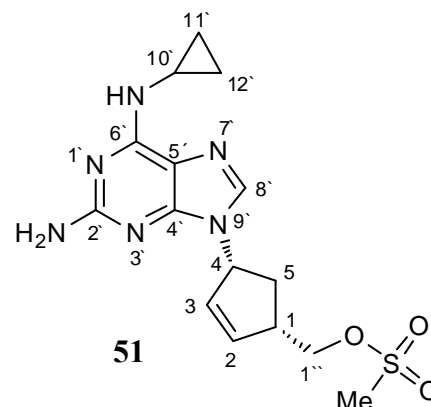
3.3.4 - Preparação do [(1*S*,4*R*)-4-(2'-amino-6-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metil metanossulfonato (**51**)

A uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 200 mg, 0,70 mmol) em diclorometano seco (11 mL), sob atmosfera de azoto, adicionou-se Et_3N (1,0 eq., 97 μL , 0,70 mmol) e cloreto de mesilo (1,0 eq., 54 μL , 0,70 mmol). A mistura foi deixada sob agitação em banho de gelo. Controlou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica] e decorridas 1,5 horas retirou-se o banho de gelo e a reacção permaneceu sob agitação por mais 1h após o que se adicionaram mais 0,4 eq. de Et_3N e 0,4 eq. de cloreto de mesilo. Decorridas 4,75 horas do início da reacção adicionou-se água destilada gelada (30 mL) e extraiu-se com diclorometano (4 x 10 mL). Reuniram-se as fases orgânicas e secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e o solvente destilado a pressão reduzida. Purificou-se a mistura resultante por c.c.f.p. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica, 2 eluições] tendo-se isolado o composto pretendido com um rendimento de 42%.

^1H -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 7,45 (1H, s, H_8), 6,03-6,01 (1H, m, H_2), 5,88-5,86 (1H, m, H_3), 5,47-5,45 (1H, m, H_4), 4,26-4,23 (2H, m, $\text{H}_{1'}$), 3,15-3,13 (1H, m, H_1), 2,95 (3H, s,

CH_3) 2,91 (1H, s largo, $\text{H}_{10'}$), 2,81-2,72 (1H, m, H_{5a}), 1,70-1,62 (1H, m, H_{5b}), 0,74-0,72 (2H, m, $\text{H}_{11a'}$ e $\text{H}_{12a'}$), 0,52-0,48 (2H, m, $\text{H}_{11b'}$ e $\text{H}_{12b'}$).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 160,1 ($\text{C}_{2'}$ ou $\text{C}_{6'}$), 156,3 ($\text{C}_{2'}$ ou $\text{C}_{6'}$), 150,8 (C_4'), 138,3 (C_2), 135,4 (C_8'), 131,6 (C_3), 114,7 (C_5'), 71,2 ($\text{C}_{1'}$), 58,9 (C_4), 44,6 (C_1), 37, 4 (CH_3) 34,2 (C_5), 23,6 ($\text{C}_{10'}$), 7,3 ($\text{C}_{11'}$ e $\text{C}_{12'}$).



3.3.5 - Ensaio para a preparação do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}clorometano (**52**)

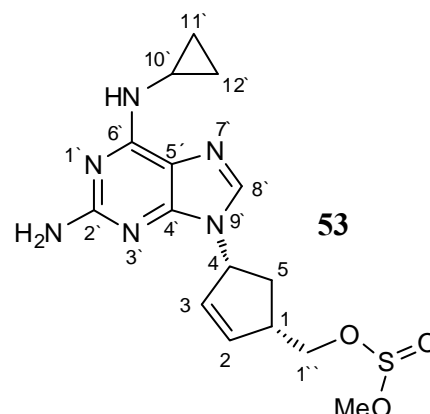
Num balão contendo uma solução de abacavir (**5**) (1,0 eq., 200 mg, 0,70 mmol) em diclorometano seco (11 mL) adicionou-se cloreto de tionilo (5,8 eq., 300 μL , 4,00 mmol). Deixou-se a mistura sob agitação e atmosfera de azoto. Controlou-se por c.c.f. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,1), sílica]. Decorridas 3,5 horas de reacção evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e co-evaporou-se com tolueno. Dispersou-se a amostra em celite e purificou-se a mistura reaccional por c.c. [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0,05), sílica]. Isolou-se o composto {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}metil metanossulfato (**53**) com um rendimento de 20%.

^1H -RMN (MeOD) δ (ppm): 7,73 (1H, s, H_8'), 6,16- 6,15 (1H, m, H_2), 5,98-5,8 (1H, m, H_3), 5,53 (1H, s largo, H_4), 4,08-3,99 (2H, m, $\text{H}_{1'}$), 3,61 (1H, s, CH_3), 3,19 (1H, s largo, H_1), 2,91-2,88 (1H, m, $\text{H}_{10'}$), 2,87-2,81 (1H, m, H_{5a}), 1,74-1,67 (1H, m, H_{5b}), 0,89-0,79 (2H, m, $\text{H}_{11a'}$ e $\text{H}_{12a'}$), 0,62-0,59 (2H, m, $\text{H}_{11b'}$ e $\text{H}_{12b'}$).

^{13}C -RMN (MeOD) δ (ppm): 159,8 ($\text{C}_{2'}$ ou $\text{C}_{6'}$), 158,1 ($\text{C}_{2'}$ ou $\text{C}_{6'}$), 149,6 (C_4'), 138,1 (C_2), 137,3 (C_8'), 132,0 (C_3), 115,0 (C_5'), 65,6 ($\text{C}_{1'}$), 60,6 (C_4), encoberto pelo sinal do solvente (CH_3), 46,6 (C_1), 35,8 (C_5), 24,5 ($\text{C}_{10'}$), 7,8 ($\text{C}_{11'}$ e $\text{C}_{12'}$).

IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$: 1266 ($\text{S}=\text{O}$).

EM (ESI) m/z : 365 [MH] $^+$, 191 [MH_2 -(ciclopent-2-en-1-il)metil metanossulfato] $^+$.



3.4 - Preparação de aductos a partir de aldeídos derivados do abacavir

3.4.1. - Reacções com aminoácidos e péptidos

3.4.1.1 - Reacção com o valinato de etilo

Método I

Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo em tampão Tris (pH=7,4, 50 mM) THF ou tampão fosfato (pH=7,4, 50 mM) (Tabela 9). Adicionou-se hidrogenocarbonato de sódio e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se uma solução da mistura reaccional obtida no ensaio **1** e **2**, segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.1** (Tabela 9), em THF (0,5 mL a 1,5 mL). Incubou-se a mistura reaccional a 37°C e controlou-se por HPLC analítico (analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 10 min de 15 - 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 0% de acetonitrilo). Em alguns dos ensaios adicionou-se cianoboro-hidreto de sódio (NaBH₃CN), após um período de tempo variável de reacção. As misturas reaccionais foram analisadas por LC-MS.

Tabela 9 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios efectuados na reacção do hidrocloreto de valinato de etilo com as misturas reaccionais, obtidas na oxidação do abacavir pelo método de Swern.

Ensaio	Solvente	Val-OEt (eq.)	NaBH ₃ CN (eq.)	Tempo (horas)
A ^a	Tris pH=7,4, 50 mM	0,09	-	-
B ^a		0,09	4,69	2,0
C ^a	THF	1,00	-	-
D ^a		1,00	1,00	1,0
F ^b	THF	1,00	-	-
G ^b		1,00	1,00	1,0
E ^a	Tampão fosfato pH=7,4, 50 mM	0,71	0,18	0,5

O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formilação apresentam rendimento de 100%.

^a A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio **1**, descrito em **3.3.2.6.1**.

^b A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio **2**, descrito em **3.3.2.6.1**.

Método II

Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (4,0 eq.), em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM, adicionou-se hidrogenocarbonato de sódio 4,0 eq. e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se uma solução de (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (**26**) (1,0 eq.) ou 4-(2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il)ciclopent-2-enilcarbaldeído (**25b**) (1,0 eq.) em THF (125 µL a 1,0 mL). Incubou-se a mistura reaccional a 37°C e deixou-se sob agitação durante um período de tempo variável após o qual se adicionou uma quantidade variável de cianoboro-hidreto de sódio (Tabela 10). O andamento da reacção foi seguido por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de 10 min de 15 a 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo).

Tabela 10 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com o hidrocloreto de valinato de etilo, a partir de 26 e 25b .

Ensaio	Composto de partida	NaBH ₃ CN (eq.)	Tempo (horas)
A ^a	26	7,2	0,50
B ^a	26	7,2	1,00
C ^a	26	7,2	2,00
D ^a	26	2,8	3,00
E ^a	26	18,0	3,00
F ^a	26	2,8	19,45
G ^a	26	18,0	19,45
H ^a	26	11,0	0,50
I ^a	25b	11,0	0,50

^a Após a adição do cianoboro-hidreto de sódio evaporou-se a mistura resultante sob pressão reduzida e prosseguiu-se com a degradação de Edman (3.4.1.1.1).

3.4.1.1.1 - Método geral para a degradação de Edman

Às amostras obtidas segundo os ensaios apresentados no método II em 3.4.1.1 (tabela 9) adicionaram-se 250,0 µL de DMF. De seguida adicionaram-se 10,0 µL de solução NaOH 1M e por fim adicionaram-se 1,5 µL de fenilisotiocianato. Incubaram-se as misturas a 37°C durante 2 horas a 800 rpm e posteriormente as misturas ficaram a 45° C durante 1,5 horas. Adicionou-se H₂O destilada (2,5 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (2,5 x 2). Evaporou-se

o solvente sob pressão reduzida e analisou-se o produto obtido por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 10 min de 15 - 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 0% de acetonitrilo) e LC-MS.

3.4.1.1.2 - Preparação do aducto de Edman (**50**)

Método I

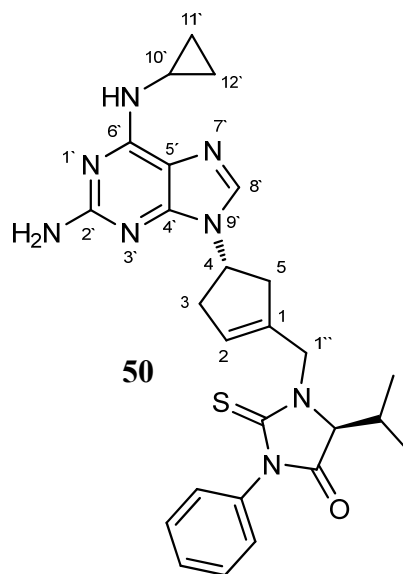
Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (4,0 eq., 20 mg, 0,11 mmol), em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM (0,4 mL), adicionou-se hidrogenocarbonato de sódio 4,0 eq. e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se uma solução de (*S*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (**26**) (1,0 eq., 8 mg, $2,8 \times 10^{-5}$ mol) em THF (1,0 mL). Incubou-se a mistura reaccional a 37°C e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas após o qual se adicionaram 11,0 eq. de cianoboro-hidreto de sódio. À mistura resultante adicionaram-se 250,0 µL de DMF. De seguida adicionaram-se 10,0 µL de solução NaOH 1M e por fim adicionaram-se 1,5 µL de fenilisotiocianato. Incubou-se a mistura a 37°C durante 2 horas a 800 rpm e posteriormente a mistura ficou a 45° C durante 1,5 horas. Adicionou-se H₂O destilada (2,5 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (2,5 x 2). Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Após purificação por HPLC semi-preparativo, utilizando um gradiente linear de 15 min. a 0-100% de acetonitrilo seguido de 2 min. a 100% de acetonitrilo e de um gradiente linear de 8 min. até 0% de acetonitrilo, que se manteve durante 10 min., isolaram-se dois produtos que foram analisados por RMN e por LC-MS. Obteve-se o composto [*{(S)-4-(2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il)ciclopent-1-en-1''-il} metil*]-6''-isopropil-9''-fenil-3''-tioxoimidazolidin-5''-ona (aducto de Edman, **50**) com um rendimento de 15% (2,1 mg).

¹H-RMN (MeOD) δ(ppm): 7,79 (1H, s, H₈), 7,49-7,41 (3H, m, *p*-Ar e *m*-Ar), 7,23 (2H, d, J=7,5, *o*-Ar), 5,87 (1H, s largo, H₂), 5,17-5,14 (2H, m, H₄ e H_{1a}'), 4,27-4,26 (2H, m, H_{1b}' e H₆'), 2,96-3,05 (2H, m, H_{3a} e H_{5a}), 2,90 (1H, s largo, H₁₀'), 2,78-2,75 (1H, m, H_{5b}), 2,68-2,64 (1H, m, H_{3b}), 2,55-2,47 (1H, m, H₇'), 1,24 (3H, d, J=7,0, H_{8a}'), 0,94 (3H, d, J=6,8, H_{8b}'), 0,88-0,84 (2H, m, H₁₁' e H₁₂'), 0,64-0,61 (2H, m, H₁₁' e H₁₂').

¹³C-RMN (MeOD) δ(ppm): 183,0 (C=S), 172,5 (C=O), 159,6 (C_{2'} ou C_{6'}), 155,6 (C_{2'} ou C_{6'}), 150,4 (C_{4'}), 137,0 (C₁), 136,1 (C_{8'}), 133,9 ppm (C_{9'}), 128,6 (C *o*-Ar ou C *m*-Ar ou C *p*-Ar) 128,5 (C *o*-Ar ou C *m*-Ar ou C *p*-Ar), 126,8 (C₂), 113,1 (C_{5'}), 66,2 (C_{6''}), 53,3 (C₄), 44,5 (C_{1''}), 40,2 (C₃), 38,7 (C₅), 28,9 (C_{7''}), 22,9 (C_{10'}), 16,4 (C_{8a''}-H₃), 14,6 (C_{8b''}-H₃), 6,2 (C_{11'} e C_{12'})

EM (ESI) m/z: 503 [MH]⁺, 235 [MH-hidantoína]⁺, 313 [MH- ciclopenteno]⁺ 191 [anel purínicoH]⁺.

UV, λ_{max} 236, 264, 296 nm



Método II

Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (4,0 eq., 26 mg, 0,14 mmol), em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM (0,4 mL), adicionou-se hidrogenocarbonato de sódio 4,0 eq. e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se uma solução de (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-2-enilcarbaldeído (**25b**) (1,0 eq., 10 mg, 3,5x10⁻⁵ mol) em THF (1,0 mL). Incubou-se a mistura reaccional a 37°C e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas após o qual se adicionaram 11,0 eq. de cianoboro-hidreto de sódio. À mistura resultante adicionaram-se 250,0 µL de DMF. De seguida adicionaram-se 10,0 µL de solução NaOH 1M e por fim adicionaram-se 1,5 µL de fenilisotiocianato. Incubou-se a mistura a 37°C durante 2 horas a 800 rpm e posteriormente a mistura ficou a 45° C durante 1,5 horas. Adicionou-se H₂O destilada (2,5 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (2,5 x 2). Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Após purificação por HPLC semi-preparativo, utilizando um gradiente linear de 15 min. a 0-100% de acetonitrilo seguido de 2 min. a 100% de acetonitrilo e de um gradiente linear de 8 min. até 0% de acetonitrilo, que se manteve durante 10 min., obteve-se o composto **50** (aducto de Edman) com um rendimento de 3% (0,5 mg).

3.4.1.2 - Reacção com a lisina

Método I

Preparou-se uma solução de lisina (4 eq., 129 mg, 0,88 mmol) em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM (1,0 mL) à qual se adicionou a mistura reaccional obtida no ensaio **1**, segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.1**, em THF (0,5 mL). A mistura ficou em agitação durante 0,5 horas, após o que se adicionou NaBH₃CN (4,0 eq., 55 mg, 0,88 mmol). A mistura obtida foi purificada por HPLC semi-preparativo (gradiente linear de 10 min. de 0 a 5% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 10 min de 5% a 10% e de 10 min. até 100% de acetonitrilo) e o produto isolado analisado por ¹H-RMN.

O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formulação apresentam rendimento de 100%.

Método II

Preparou-se uma solução de lisina (1,5 eq., 74 mg, 0,51 mmol) em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM (2,0 mL) à qual se adicionou a mistura reaccional obtida no ensaio **1**, segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.1**, em THF (1,0 mL). A mistura ficou em agitação durante 0,5 horas, após o que se adicionou NaBH₃CN (0,2 eq., 4 mg, 0,06 mmol). Analisou-se a mistura reaccional por HPLC analítico analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 10 min de 15 - 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 0% de acetonitrilo) e por LC-MS.

O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formulação apresentam rendimento de 100%.

Método III

Preparou-se uma solução de lisina (8,0 eq., 34 mg, 0,23 mmol) em tampão fosfato pH=7,4, 50 mM (1 mL). Adicionou-se uma solução de (*S*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (**26**) (1,0 eq., 8 mg, 0,03 mmol), em THF (1,5 mL). Incubou-se a mistura reaccional a 37° C e sob agitação. Após 0,5 horas de reacção adicionou-se NaBH₃CN (1,1 eq., 2 mg, 0,32 mmol). Analisou-se a mistura reaccional por HPLC analítico analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 10 min de 15 - 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 0% de acetonitrilo) e por LC-MS.

3.4.1.3 - Reacção com a Fmoc-lisina

A uma solução da mistura reaccional obtida no ensaio **1** segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.1**, em THF (0,5 mL) adicionou-se Fmoc-lisina (4,0 eq., 350 mg, 0,86 mmol). A mistura ficou sob agitação durante 0,5 horas, após o que se adicionou NaBH₃CN (15,7 eq., 217 mg, 3,46 mmol). Analisou-se a mistura resultante por HPLC analítico (gradiente linear de 25 min. de 5 - 46% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 2 min de 46 - 100% de acetonitrilo seguido de 3 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 5% de acetonitrilo) e por LC-MS.

O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formilação apresentam rendimento de 100%

3.4.1.4 - Reacção com a N-acetil-cisteína

A uma solução de 1,0 eq. do composto de (*S*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (**26**) ou da mistura reaccional obtida segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.1**, em THF adicionou-se uma solução de N-acetil-cisteína em solvente apropriado (Tabela 11). A mistura ficou sob agitação durante um período de tempo (24 ou 75 horas) e a temperatura (t.a. ou 37°C) variáveis (Tabela 11). Controlou-se por HPLC analítico e purificaram-se as misturas por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 25% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 5 min de até 0% de acetonitrilo). Analisara-se os produtos obtidos por LC-MS (ESI) e por ¹H-RMN.

Tabela 11 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com a N-acetil-cisteína.

Ensaio	Solvente	N-acetil-cisteína (eq.)	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
A ^a	Tampão Tris pH=7,4, 50 mM	1,0	t.a.	24,0
B ^b	Tampão Tris pH=7,4, 50 mM	1,5	37	75,0
C ^c	Tampão fosfato pH=7,4, 50 mM	4,0	37	24,0

^a A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio **3**, descrito em **3.3.2.6.1**. **O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formilação apresentam rendimento de 100%.**

^b O material de partida adicionado foi o composto **26** (1,0 eq., 3 mg, 0,01 mmol), obtido no ensaio **3**, descrito em **3.3.2.6.1**.

^c O material de partida adicionado foi o composto **26** (1,0 eq., 7 mg, 0,02 mmol), obtido segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.2**.

3.4.1.5 - Reacção com a glutathiona (GSH)

A uma solução de GSH (4,0 eq., 7,3 mg, $5,6 \times 10^{-5}$ mol) em tampão fosfato pH 7,4, 50 mM (500 μ L) foi adicionada uma solução do composto **26** (1,0 eq., 4 mg, $1,41 \times 10^{-5}$ mol). A solução obtida foi incubada a 37°C durante 24 horas e posteriormente analisada por LC-MS (ESI).

3.4.1.6 - Reacção com a 2'-desoxiguanosina (dG)

Preparou-se uma solução de dG (1,0 eq., 25 mg, 0,09 mmol) em DMF/H₂O (570 μ L: 285 μ L). Adicionou-se uma solução das misturas reaccionais obtidas segundo os ensaios 1 e 2, descritos em 3.3.2.6.1, em THF (Tabela 12). A mistura reaccional ficou sob agitação. Em alguns ensaios após 1 hora de reacção adicionou-se NaBH₃CN (1,0 eq., 6 mg, 0,09 mmol). Analisaram-se as misturas reaccionais por HPLC analítico analítico (gradiente linear de 10 min. de 0 a 5% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 10 min de 5 a 10% de acetonitrilo e de 10 min. até 0% de acetonitrilo) e por LC-MS (ESI).

Tabela 12 - Condições experimentais dos ensaios da reacção com a 2'-desoxiguanosina, a partir de misturas reaccionais.

Ensaio	NaBH ₃ CN (eq.)	Tempo (horas)
A ^a	-	
B ^a	1,00	1,0
C ^b	-	
D ^b	1,00	1,0

O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formulação apresentam rendimento de 100%.

^a A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio 1, descrito em 3.3.2.6.1.

^a A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio 2, descrito em 3.3.2.6.1.

3.4.2 - Reacção com a Hemoglobina Humana (Hb)

Preparou-se uma solução de Hb em tampão fosfato pH=7,4, 0,1 M, (entre 0,8 mL e 1 mL de tampão fosfato para 1 mg de Hb) à qual se adicionou uma solução de (S)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9H-purin-9'-il]ciclopent-1-enilcarbaldeído (**26**) ou da mistura reaccional obtidos segundo os ensaios 1 e 9, descritos em 3.3.2.6.1, em THF. Incubou-se a 37° C, com agitação durante um período de tempo variável (Tabela 13). Decorrido este

período de tempo adicionou-se uma quantidade variável de NaBH₃CN e incubou-se durante um máximo de 24 horas. No final destilou-se o solvente a pressão reduzida.

Tabela 13 - Condições experimentais dos ensaios da modificação da Hb com o aldeído conjugado (26)

Ensaio	Hb (mg)	NaBH ₃ CN (eq.)	Tempo (horas)
A ^a	3,10	12,0	0,50
B ^a	3,10	12,0	1,00
C ^a	3,10	12,0	2,00
D ^b	2,50	2,8	3,00
E ^b	2,50	18,0	3,00
F ^b	2,50	2,8	19,45
G ^b	2,50	18,0	19,45
H ^c	2,25	2,0	0,50
I ^c	2,25	2,0	1,00
J ^c	2,25	2,0	1,50
K ^c	2,25	2,0	2,00
L ^c	2,25	2,0	2,50
M ^c	2,25	2,0	3,00
N ^c	2,25	2,0	3,50
O ^c	2,25	20,0	24,00

^a O material de partida adicionado foi o composto **26** (1,0 eq., 2,5 mg, 8,79 µmol), obtido no ensaio **9**, descrito em **3.3.2.6.1**, dissolvido em THF (125 µL).

^b O material de partida adicionado foi o composto **26** (1,0 eq., 1,6 mg, 5,63 mmol), obtido segundo o procedimento descrito em **3.3.2.6.2**, dissolvido em THF (125 µL).

^c A mistura reaccional adicionada corresponde ao ensaio **1**, descrito em **3.3.2.6.1**. **O número de equivalentes apresentado tem em conta o pressuposto de que as reacções de formilação apresentam rendimento de 100%.**

3.4.2.1 - Hidrólise da valina terminal por degradação de Edman

A hidrólise da valina terminal das reacções com modificação da hemoglobina humana foi efectuada segundo o procedimento descrito em **3.4.1.1.1**. Analisaram-se as misturas resultantes por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 10 min de 15 - 100% de acetonitrilo seguido de 10 min. de 100% de acetonitrilo e 5 min. até 0% de acetonitrilo) e por LC-MS.

3.4.3 - Reacção com a Albumina do soro humano (HSA)

Método I

A uma solução de HSA (2 mg) em PBS (4 mL) foi adicionada uma solução de aldeído conjugado (**26**) (1,0 eq., 2 mg, $7,04 \times 10^{-6}$ mol) em THF (100 μ L). A solução foi incubada durante 30 min. Após o que foi adicionado NaBH_3CN (4,1 eq., 2 mg, $2,90 \times 10^{-5}$ mol) seguida de incubação a 37°C durante a noite.

Método II

A uma solução de HSA (2 mg) em PBS (4 mL) foi adicionada uma solução de aldeído conjugado (**26**) (1,0 eq., 2 mg, $7,04 \times 10^{-6}$ mol) em THF (100 μ L). Tendo sido posteriormente incubada a 37°C durante a noite.

3.4.3.1 - Hidrólise enzimática da HSA modificada com o aldeído conjugado 26

À solução obtida após modificação da HSA com o composto **26** (secção 3.4.4, método I e II), foi adicionada uma solução de pronase E 0,53 mg/mL (20 μ L) e de uma solução de LAP 0,13 mg/mL (10 μ L). As soluções foram posteriormente gentilmente agitadas e incubadas a 37°C durante 20h. Uma aliquota (1 mL) da solução final foi analisada por LC-MS (ESI), sem qualquer tratamento. A restante solução (3 mL) foi purificada por *sep-pack* RP-18: o hidrolisado foi inicialmente introduzido no cartucho, fez-se uma primeira eluição com água (2 mL) e depois com metanol (4 mL). A fracção de metanol foi primeiro destilada a pressão reduzida e posteriormente re-dissolvida em metanol (200 μ L) e analisada por LC-MS (ESI).

3.5 - Reacção de outros compostos derivados do abacavir com aminoácidos

3.5.1 - Reacção do [(1*S*,4*R*)-4-(2'-amino-6-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il)ciclopent-2-en-1-il]metil metanossulfonato (**51**) com o valinato de etilo

Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (2,0 eq., 11 mg, 0,06 mmol) em acetonitrilo (1 mL), adicionou-se de hidrogenocarbonato de sódio (2,0 eq., 5 mg,

0,06 mmol) e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se o composto **51** (1,0 eq., 11 mg, 0,03 mmol) em acetonitrilo (1 mL). Controlou-se por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,1), sílica] e por HPLC (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 5 min até 0% de acetonitrilo). Após 6 dias adicionaram-se mais 2,0 eq. de hidrogenocarbonato de sódio e posteriormente colocou-se a mistura reaccional em banho de óleo a 40° C.

3.5.2 - Reacção do {(1*S*,4*R*)-4-[2'-amino-6'-(ciclopropilamino)-9*H*-purin-9'-il]ciclopent-2-en-1-il}metil metanossulfato (53**) com o valinato de etilo**

Preparou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (2,0 eq., 24 mg, 0,10 mmol) em acetonitrilo (2 mL), adicionaram-se de hidrogenocarbonato de sódio (2,0 eq., 11 mg, 0,10 mmol) e deixou-se sob agitação durante 0,5 horas. A esta solução adicionou-se o composto **53** (1,0 eq., 20 mg, 0,05 mmol) em acetonitrilo (1 mL) e Et₃N (1,0 eq., 10 µL, 0,05 mmol). A mistura reaccional ficou sob atmosfera de azoto e agitação. Controlou-se por c.c.f. [CH₂Cl₂/MeOH (1:0,01), sílica] e por HPLC analítico analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 - 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, 5 min de 0% de acetonitrilo seguido de 2 min. de 0% de acetonitrilo). Após 3 dias de reacção adicionaram-se mais 2,0 eq. de hidrocloreto de valinato de etilo e de hidrogenocarbonato de sódio. Colocou-se a mistura reaccional em banho de óleo a 40° C e deixou-se sob agitação até ao dia seguinte. Analisou-se por HPLC analítico (gradiente linear de 20 min. de 0 a 15% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%, seguido de gradiente linear de 5 min até 0% de acetonitrilo) e LC-MS.

3.6 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica de fígado de rato

A uma solução aquosa de abacavir (3µg/mL) adicionou-se a solução de citosol (1 mg/mL) em tampão pirofosfato de sódio, pH=8,8, 50 mM. De seguida adicionou-se uma solução de NAD⁺ 7,5 mM e incubou-se a 37° C com agitação. Preparou-se um branco que não continha a fracção correspondente ao NAD⁺. Os ensaios foram feitos em triplicado. Após 2 horas e 20 horas de reacção retiraram-se aliquotas de 500 µL, num total de 1 mL por ensaio. Colocou-se em banho de gelo durante 5 minutos, transferiu-se para filtros de crivagem molecular *Amicon*®, 0,5 mL e centrifugou-se durante 15 minutos, a 14000 g e a 4° C. Recolheu-se o sobrenadante. As amostras obtidas foram analisadas por LC-MS e comparadas com os compostos padrão **26** e **25b**.

3.6.1 - Ensaio de incubação do abacavir na fracção citosólica com o hidrocloreto de valinato de etilo

Repetiu-se o procedimento descrito em **3.5**, sendo que após o arrefecimento das amostras adicionou-se uma solução de hidrocloreto de valinato de etilo (4 eq.) em tampão pirofosfato de sódio, pH=8,8, 50 mM. Incubou-se a 37° C e deixou-se sob agitação durante 30 minutos. Decorrido este período de tempo adicionou-se NaBH₃CN (0,1 mg). Transferiu-se para filtros de crivagem molecular *Amicon*®, 0,5 mL e centrifugou-se durante 15 minutos, a 14000 g e a 4° C. Recolheu-se o sobrenadante. Evaporou-se à secura e prosseguiu-se com a reacção de formação de aducto de Edman (em 250,0 µL de DMF com adição de 10,0 µL de solução NaOH 1M e 1,5 µL de PTIC) As amostras obtidas foram analisadas por LC-MS.

Capítulo 4 - Bibliografia

- 1 AIDS epidemic update, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) **2009**.
- 2 Mehellou, Y.; Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2010** 53, 521–538.
- 3 Cos, P.; Maes L.; Berghe, D.V.; Hermans, N.; Pieters, L.; Vlietinck, A. *J. Nat. Prod.* **2004** 67, 284-293.
- 4 <http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/PDF/hiv2.pdf>, acedido em 25-08-2010.
- 5 Betsy, T.; Keogh, J. *Microbiology Demystified*; McGraw-Hill: USA, **2005** capítulo 12.
- 6 Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, L. ; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*; 5 ed, W.H.Freeman & Co Ltd: USA; **2003** p.44.
- 7 http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=483, acedido em 25-08-2010.
- 8 <http://www.apositivelife.com/forasos/biology-of-hiv.html>, acedido em 25-08-2010.
- 9 Yang, S.S.; Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Bader, J.P. *J. Nat. Prod.* **2001** 64, 265-277.
- 10 http://www.nature.com/nature/journal/v410/n6831/fig_tab/410963a0_F1.html, acedido em 25-08-2010
- 11 Bell, T.W.; Anugu, S.; Bailey, P.; Catalano, V.J.; Dey, K.; Drew, M.G.B.; Duffy, N.H.; Jin, Q.; Samala, M.F.; Sodoma, A.; Welch, W.H.; Schols, D.; Vermeire, K. *J. Med. Chem.* **2006** 49, 1291-1312.
- 12 Proffitt, M.R. *Analytical Chemistry* **1993** 65, 396-400
- 13 B. Narins; *World Of Microbiology and Immunology*; Thomson.
- 14 Ni, J.; Song, H.; Wang, Y.; Stamatou, N.M.; Wang, L. *Bioconjugate Chem.* **2006** 17, 493-500.
- 15 Nakahara, T.; Nomura, W.; Ohba, K.; Ohya, A.; Tanaka, T.; Hashimoto, C. Narumi, T.; Murakami, T.; Yamamoto, N.; Tamamura, H.; *Bioconjugate Chem.* **2010** 21, 709–714.
- 16 <http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7286/full/464161a.html>, acedido em 25-08-2010

- 17 Clercq, E. *Future Med. Chem.* **2010** 2 (7), 1049-1053.
- 18 Clercq, E. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002** 1, 13-25.
- 19 Clay, P.G. *Clinical Therapeutics* **2002** 24, 1502-1514.
- 20 <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=14514>, acedido em 25-08-2010
- 21 Yuen, G.J.; Weller, S.; Pakes, G.E. *Clinical Pharmacokinet* **2008** 47(6), 351-371.
- 22 Robertson, J.G.; *Biochemistry* **2005** 44, 5561-5571.
- 23 Huff, J.R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999** 7, 2667-2669.
- 24 Daluge, S.M.; Martin, M.T.; Sickles, B. R.; Livingston, D.A. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2000** 19, 297-327.
- 25 Calmy, A.; Hirschel, B.; Cooper, D.A.; Carr, A. *Lancet* **2007** 370, 12-14.
- 26 Nolan, D. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* **2009** 46(3), 153–165.
- 27 Walsh, J.S.; Reese, M.J.; Thurmond, L.M. *Chemico-Biological Interactions* **2002** 142, 135-154.
- 28 McDowell, J.A.; Chittick, G.E.; Ravitch, J.R.; Polk, R.E.; Kerkering, T.M.; Stein, D.S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999** 43, 2855-2861.
- 29 Chui, C.K.S.; Brumme, Z.L.; Brumme, C.J.; Yip, B.; Phillips, E.J.; Montaner, J.S.G.; Harrigan, P.R. *HIV/AIDS • CID* **2007** 44, 1503-1508.
- 30 Yang, X.; Hu, Z.; Chan, S.Y.; Zhou, S. *Clinica Chimica Acta* **2006** 365, 9-29.
- 31 Bakhtiar, R. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2008** 57, 85-91.
- 32 Swenberg, J. A.; Fryar-Tita, E.; Jeong, Y.; Boysen, G. Starr, T.; Walker, V. E.; Albertini, R. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008** 21, 253-265.
- 33 Antunes, A. M. M.; Godinho, A. L. A.; Martins, I. L.; Oliveira, M. C.; Gomes, R. A.; Coelho, A. V.; Belandand, F. A.; Marques, M. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2010** (Article ASAP, DOI: 10.1021/tx100186t)
- 34 Törnqvist M.; Fred, C.; Haglund, J.; Helleberg, H.; Paulsson, B.; Rydberg, P. *Journal of Chromatography B* **2002** 778, 279-308.

- 35 Szapacs, M.E.; Riggins, J.N.; Zimmerman, L.J.; Liebler, D.C. *Biochemistry* **2006** 45, 10521-10528.
- 36 Rydberg, P. ; L ning, B.; Wachtmeister, C. A.; Eriksson, L.; Törnqvist, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2002** 15, 570-581.
- 37 Antunes, A. M. M.; Godinho, A. L. A.; Martins, I. L.; Justino, G. C.; Belandand, F. A.; Marques, M. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2010** 23 (5), 888-899.
- 38 Tojo, G.; Fernández, M. *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones: A Guide to Current Common Practice*; 1 ed.; Springer, **2006**.
- 39 King & Spalding 1180 Peachtree Streer, NE Atlanta, Ga 30309-3521 (US).
- 40 The Wellcome Foundation Limited, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).
- 41 Khazaei, A.; Mehdipour, E.; Yadegari, E. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2004** 179, 437-441
- 42 Fréchet, J.M. J.; Warnock, J.; Farrall, M. J. *J. Org. C'hem.* **1978** 43(13), 2618-2621.
- 43 Bergbreiter, D. E.; Chandran, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985** 107, 4792-4793.
- 44 Green, M. P.; Prodger J. C.; Hayes C. J. *Tetrahedron Letters* **2002** 43, 2649–2652.
- 45 Grozinger, K. G.; Byrne, D. P.; Nummy, L. J.; Ridges, M. D.; Salvagno, A. J. *Heterocyclic Chem.* **2000** 37, 229-239.
- 46 Trost, B. M.; Thaisrivongs, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008** 130 (43), 14092-14093.
- 47 Boyer, J. H.; Krueger, W. E.; G. J. Mikol *J. Am. Chem. Soc.* **1967** 89 (21), 5505-5506.
- 48 Hamada, Y.; Shibata, M.; Sugiura, T.; Kato, S.; Shioiri,T. *J. Org. Chem.* **1987** 52 (7), 1252-1255.
- 49 Yasuma, T.; Oi, S.; Choh, N.; Nomura, T.; Furuyama, N.; Nishimura, A.; Fujisawa, Y.; Sohda, T. *J. Med. Chem.* **1998** 41, 4301-4308.
- 50 Smith, C. W.; Saneii, H. H.; Sawyer, T. K.; Pals, D. T.; Scahill, T. A.; Kamdar, B. V.; Lawson, J. A. *J. Med. Chem.* **1988** 31, 1377-1382.
- 51 Kusch, D. *Spec. Chem. Mag.* **2006** 26, 40-41.

- 52** Davies, R.; Hedebrant, U.; Athanassiadis, I.; Rydberg, P.; Törnqvist M. *Food and Chemical Toxicology* **2009** 47, 1950–1957.
- 53** Clayden, J.; Greeves, N.; Warren S. *Organic Chemistry*; 1 ed.; Oxford University Press, **2000**.
- 54** Walker, J. M.; Sweeney, P. J. *The Protein Protocols Handbook*; Press Inc. Totowa, New Jersey, **2002**.
- 55** Kurtz, A.J.; Lloyd, R. S. *The Journal of Biological Chemistry* **2003** 278 (8), 5970–5976.
- 56** Minko, I.G.; Kozekov, I. D.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J.; Lloyd R. S.; Stone, M. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2009** 22, 759-778.
- 57** Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*; 2nd ed.; Pergamon Press: Londres, **1980**.
- 58** Ruekber, B.; Rossoni, E. *Journal of Chemical Education* **2005** 82 (9), 1310.

Os resultados obtidos neste trabalho foram parcialmente apresentados sob a forma de poster em: M.M. Marques, C. Charneira, A.M.M. Antunes “Protein adduct formation: A possible factor in hypersensitivity reactions induced by the anti HIV drug abacavir”, XII International Congress of Toxicology – IUTOX 2010, Barcelona 2010, *Toxicology Letters*, **2010**, 196S, S108